

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LEONARDO FOTI

DESENVOLVIMENTO DE UM MULTITESTE DIAGNÓSTICO PARA
TRIAGEM SOROLÓGICA DE DOADORES DE SANGUE NA PLATAFORMA DE
MICROARRANJOS LÍQUIDOS

CURITIBA

2012

LEONARDO FOTI

DESENVOLVIMENTO DE UM MULTITESTE DIAGNÓSTICO PARA TRIAGEM
SOROLÓGICA DE DOADORES DE SANGUE NA PLATAFORMA DE
MICROARRANJOS LÍQUIDOS

Tese de Doutorado apresentada como requisito
parcial para a obtenção do título de Doutor em
Ciências ao Curso de Pós Graduação em Biologia
Celular e Molecular da Universidade Federal do
Paraná

Orientador: Dr. Marco Krieger

CURITIBA

2012

FICHA CATALOGRAFICA

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Foti, Leonardo

Desenvolvimento de um multitest diagnóstico para triagem sorológica de doadores de sangue na plataforma de microarranjos líquidos. /

Leonardo Foti. – Curitiba, 2012.

196 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Marco Krieger

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Sorologia. 2. Doadores de sangue. 3. Sangue. I. Título II. Krieger, Marco III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 574.87

TERMO DE APROVAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

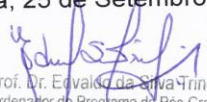
DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **Leonardo Foti**, no dia 25 de Setembro de 2012, no Setor de Ciências Biológicas (ICC) defendeu sua Tese de Doutorado em Biologia Celular e Molecular, intitulada: "Desenvolvimento de um multiteste diagnóstico para triagem sorológica de doadores de sangue na plataforma LMX", com a banca examinadora constituída, pelos Profs. Drs. Marco Aurélio Krieger (como orientador do Instituto Carlos Chagas - ICC), Alejandro Correa Dominguez (Instituto Carlos Chagas - ICC), Maria Lucia Rosa Rossetti (Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde - RS), Stênio Perdigão Fragoso (Instituto Carlos Chagas - ICC) e Sueli Massumi Nakatani (Laboratório Central do Estado - LACEN), e foi Aprovado.

A solicitação de emissão do Diploma de Doutor em Biologia Celular e Molecular ficará condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Esta declaração tem validade de 60 (sessenta) dias.

Curitiba, 25 de Setembro de 2012


Prof. Dr. Evaldo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185795

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, pelo suporte, amor e carinho;

Ao meu orientador pelo apoio, amizade e confiança;

Aos meus amigos pelo carinho e apoio;

E a todos que contribuíram e participaram na realização deste trabalho.

Muito obrigado!

Leonardo Foti

RESUMO

A identificação dos patógenos de maneira efetiva permite um tratamento eficaz, consequentemente limitando a sua dispersão. Sendo assim, é necessário o desenvolvimento contínuo de tecnologias de diagnósticos que sejam mais rápidos, sensíveis, precisos, e principalmente, multitestes, ou seja, capazes de testar vários patógenos, conjuntamente, em uma mesma amostra. Um exemplo de controle efetuado no Brasil é o dos hemocentros onde testes são realizados para determinar se as bolsas de sangue estão liberadas para transfusão. Determinada bolsa só poderá ser liberada para utilização depois de comprovadamente negativa para hepatite B, hepatite C, AIDS, Doença de Chagas, Sífilis e HTLV. Os testes utilizados para o diagnóstico destas patologias, dentro do contexto dos bancos de sangue são em sua maioria importados. Para suprir essa necessidade, nos utilizaremos da metodologia dos microarranjos líquidos. Esta faz uso da citometria de fluxo combinada à utilização de micropartículas esféricas denominadas microesferas. Os microarranjos líquidos vêm conquistando popularidade nas áreas de imunodiagnóstico e pesquisa básica, com um número cada vez maior de artigos publicados. A microesfera e o anticorpo repórter emitem fluorescência quando excitadas com raios laser e as intensidades de fluorescência são medidas através de citometria de fluxo, que é capaz de quantificar a molécula alvo capturada em cada microesfera e identificá-las, permitindo a quantificação de múltiplos alvos em uma única amostra. Este trabalho visa à obtenção de um diagnóstico multiplex capaz de detectar a presença de anticorpos e/ou antígenos circulantes para a hepatite B, hepatite C, AIDS, Doença de Chagas, Sífilis e HTLV.

ABSTRACT

The identification of pathogens effectively allows an effective treatment, thus limiting dispersion. Thus, it is necessary to the continued development of diagnostic technologies that are more rapid, sensitive, accurate, and most importantly, multitestes, ie, capable of testing various pathogens, together in the same sample. An example of control in Brazil is made at the blood centers where tests are conducted to determine if the blood bags are released for transfusion. Certain scholarship can only be released for use after proven negative for hepatitis B, hepatitis C, AIDS, Chagas disease, syphilis and HTLV. The tests used for diagnosis of these diseases within the context of blood banks are mostly imported. To meet this need, we will use the methodology of microarray liquids. This makes use of flow cytometry combined use of spherical microparticles called microspheres. The microarray liquids have gained popularity in the areas of immunodiagnosis and basic research, with an increasing number of published articles. The bead and reporter antibody fluoresce when excited with laser beams and the fluorescence intensities are measured by flow cytometry, which is able to quantify the captured target molecule in each microsphere and identify them, allowing the quantification of multiple targets in an single sample. This work aims to obtain a diagnostic multiplex capable of detecting the presence of antibodies and / or circulating antigens for hepatitis B, hepatitis C, AIDS, Chagas disease, syphilis and HTLV.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1.1 - DIFERENÇAS SOCIOECONÔMICAS NOS CENTROS URBANOS, PARAISÓPOLIS, SÃO PAULO, BRASIL FONTE: (ALIROL ET AL., 2011B)	21
FIGURA 1.2 - REPRESENTAÇÃO DE TRANSFUSÃO DE SANGUE NO INICIO DO SÉCULO XX (ALTER, H. J.; KLEIN, 2008)	23
FIGURA 1.3 - INCORPORAÇÃO DOS TESTES DIAGNÓSTICOS PELO RISCO DE TRANSMISSÃO (PERKINS; BUSCH, MICHAEL P, 2010A).....	25
FIGURA 1.4 DINÂMICA DA PARASITEMIA E DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM RELAÇÃO À PARASITEMIA AO LONGO DO TEMPO DE INFECÇÃO POR TRYPANOSOMA CRUZI (JUNQUEIRA ET AL., 2010).....	30
FIGURA 1.5 - GENOMA CIRCULAR DO HBV COM AS SUAS DIFERENTES REGIÕES CODIFICANTES (SEEGER; MASON, 2000B)	34
FIGURA 1.6 – ANTICORPOS E ANTÍGENOS CIRCULANTES NAS FASES DA INFECÇÃO POR HBV, REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS DOIS PERFIS DE INFECÇÃO POR HBV, SEUS NÍVEIS DE ANTÍGENOS E ANTICORPOS ATRAVÉS DO TEMPO, (A) ESTÃO REPRESENTADOS O NÍVEIS DOS ANTÍGENOS E ANTICORPOS DA INFECÇÃO AGUDA (B) ESTÃO REPRESENTADOS O NÍVEIS DOS ANTÍGENOS E ANTICORPOS DA INFECÇÃO CRÔNICA (GANEM; PRINCE, A. M., 2004B)	36
FIGURA 1.7 - ANALISE FILOGENÉTICA DOS GENÓTIPOS DE HCV, ARVORE FILOGENÉTICA DOS PRINCIPAIS GENÓTIPOS DO HCV E SUA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA (SIMMONDS ET AL., 2005B)	40
FIGURA 1.8 – ORGANIZAÇÃO GENÔMICA E DA POLI PROTEÍNA DE HCV, NA PARTE DE CIMA O GENOMA DO HCV COM AS REGIÕES ESTRUTURAIS NÃO TRADUZIDAS 5' E 3', REGIÃO S ONDE ESTÃO OS GENES DAS PROTEÍNAS ESTRUTURAIS E REGIÃO NS ONDE ESTÃO OS GENES PARA AS PROTEÍNAS NÃO ESTRUTURAIS. NA PARTE INFERIOR A REPRESENTAÇÃO DAS PROTEÍNAS NO RETICULO ENDOPLASMÁTICO RUGOSO, COM	

SEUS DOMÍNIOS, A TESOURA INDICA O LOCAL DE CLIVAGEM DAS PEPTIDASES SINAL. (DUBUISSON, 2007B).....	41
FIGURA 1.9 – GENÓTIPOS DE VÍRUS HIV, GENÓTIPOS DE HIV1 E HIV2 MOSTRANDO A SIMILARIDADE DA ESTRUTURA GENÔMICA E DO SEUS CONJUNTO DE PROTEÍNAS DOS DOIS PRINCIPAIS GENÓTIPOS (GALLO, ROBERT C, 2002B).....	46
FIGURA 1.10 – RESPOSTA IMUNOLÓGICA A INFECÇÃO PELO VÍRUS, REPRESENTAÇÃO DOS DIFERENTES MOMENTOS DA INFECÇÃO PELO VÍRUS HIV TENDO EM VISTA A REPOSTA IMUNOLÓGICA E A CAPACIDADE DE DETECÇÃO DA DOENÇA PELAS METODOLOGIAS DIAGNÓSTICAS DISPONÍVEIS (BUSCH, MICHAEL P ET AL., 2010A).....	48
FIGURA 1.11 – DESENVOLVIMENTO DA PATOLOGIA CAUSADA PELO VÍRUS HIV, GRÁFICO MOSTRANDO O DESENVOLVIMENTO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS HIV EXIBINDO AS FASES DE INFECÇÃO PRIMÁRIA, AGUDA, LATENTE E CRÔNICA, LEVANDO EM CONSIDERAÇÃO O TEMPO E O NÚMERO DE CÓPIAS DE RNA (FIEBIG ET AL., 2003A)	49
FIGURA 1.12 – REPRESENTAÇÃO DO GENOMA HTLV1 E HTLV2 COM OS SEUS GENES (VERDONCK ET AL., 2007B).....	52
FIGURA 1.13: DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO HTLV, DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS EM RELAÇÃO AS GRANDES MIGRAÇÕES HUMANAS PELO MUNDO (SUZUKI; GOJOBORI, 1998B)	53
FIGURA 1.14 - FLUXOGRAMA PARA INTERPRETAR O DIAGNOSTICO DE HTLV (SABINO ET AL., 1999)	54
FIGURA 3.1 - ESQUEMA DA REAÇÃO DE ACOPLAMENTO	70
FIGURA 3.2 MATRIZ GERADA A PARTIR DE UM CONJUNTO DE INSTÂNCIAS.	73
FIGURA 4.1 - SCATTER PLOT COM 95%IC DAS MIF DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ENSAIO AVALIADAS, ENSAIOS NA PRESENÇA SEM A ADIÇÃO DE EXTRATO DE E.COLI, COM A ADIÇÃO DE EXTRATO DE E.COLI 0,1% E COM EXTRATO DE E.COLI 1%.....	83
FIGURA 4.2 - COMPARAÇÃO DE CUTOFF DAS ANÁLISES ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS.....	85

FIGURA 4.3 – GRÁFICOS DO RESULTADO DA CONTAGEM DAS BEADS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPO EM SEGUNDOS E NÚMERO INICIAL DE MICROESFERAS DILUÍDAS POR POÇOS (BARRAS COLORIDAS).....	86
FIGURA 4.4 – OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO PADRÃO RECOMENDADO PELO FABRICANTE B) MOSTRA O ENSAIO OTIMIZADO COM A REDUÇÃO DE UMA HORA DE ENSAIO	87
FIGURA 4.5 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ACOPLAMENTOS DE CRAFTA; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC	89
FIGURA 4.6- GRÁFICO DAS CURVAS ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO CHAGAS LISADO; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.....	92
FIGURA 4.7 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO CHAGAS MULTIAANTÍGENO; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.....	95
FIGURA 4.8 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS MELHORES CONDIÇÕES DE ACOPLAMENTOS DOS ANTÍGENOS DE CHAGAS; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.....	98
FIGURA 4.9 ANÁLISE DE COMBINAÇÃO ANTÍGENO + ANTÍGENO DE CHAGAS, GRÁFICO DAS PARÂMETROS OBTIDOS DA ANÁLISE DE CONTINGÊNCIA COM OS PARÂMETROS UTILIZADOS PARA AVALIAR A COMBINAÇÃO DOS ANTÍGENOS	99
FIGURA 4.10- GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ACOPLAMENTOS DE HBV CORE; ((A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.	100
FIGURA 4.11 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HBV CORE 183, (A)	

	CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.....	102
FIGURA 4.12 -	GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HBV CORE 8914 CARBO 25 μ G//ML; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.....	104
FIGURA 4.13 -	GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HBV CORE 8927 PBS 25 μ G//ML; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.....	105
FIGURA 4.14	GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HBV CORE 8929, (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.....	106
FIGURA 4.15 -	GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HBV CORE DELTA; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.....	107
FIGURA 4.16 -	GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HBV CORE DELTA; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.....	109
FIGURA 4.17 -	GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DOS ANTÍGENO DE HBV CORE; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.....	112
FIGURA 4.18 –	ANÁLISE DE COMBINAÇÃO ANTÍGENO + ANTÍGENO DE HBV CORE GRÁFICO DAS PARÂMETROS OBTIDOS DA ANÁLISE DE CONTINGÊNCIA COM OS PARÂMETROS UTILIZADOS PARA AVALIAR A COMBINAÇÃO DOS ANTÍGENOS	117
FIGURA 4.19 -	GRÁFICO DA CURVA ROC CONDIÇÃO DE ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HCV MULTIAANTÍGENO; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.	119

FIGURA 4.20 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HCV MERIDIAN; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.....	120
FIGURA 4.21 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HCV NS3; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.	121
FIGURA 4.22 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DOS ANTÍGENOS DE HCV; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.....	124
FIGURA 4.23 ANÁLISE DE COMBINAÇÃO ANTÍGENO + ANTÍGENO DE (A) CORRESPONDE A ÁREA ABAIXO DA CURVA CALCULADA PELA ANÁLISE CURVA ROC	126
FIGURA 4.24 - GRÁFICO DA CURVA ROC HIV P17-24,GP41-120 DAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS; (A) CORRESPONDE A ÁREA ABAIXO DA CURVA CALCULADA PELA ANÁLISE CURVA ROC.....	127
FIGURA 4.25 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HIV P17-24, GP41-120 DAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.	129
FIGURA 4.26 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HIV BIOM DAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.	131
FIGURA 4.27 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HIV GP36 DAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC	133

FIGURA 4.281 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HIV GP41 DAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC	135
FIGURA 4.29 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DOS ANTÍGENOS; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC	138
FIGURA 4.30- GRÁFICO DOS PARÂMETROS OBTIDOS DA ANÁLISE DE COMBINAÇÃO ANTÍGENO + ANTÍGENO DE HIV UTILIZADOS PARA AVALIAR A COMBINAÇÃO DOS ANTÍGENOS. (A) CORRESPONDE A ÁREA ABAIXO DA CURVA CALCULADA PELA ANÁLISE CURVA ROC	139
FIGURA 4.31 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HTLV1 E1 MVT PBS; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.....	142
FIGURA 4.321 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HTLV1 E701 PBS 100 ; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.....	143
FIGURA 4.33 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HTLV GP21 DAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC	144
FIGURA 4.34 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HTLV GP46 DAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC	146
FIGURA 4.35 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HTLV P24 DAS DIFERENTES	

CONDIÇÕES AVALIADAS; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC	147
FIGURA 4.36 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HTLV2 FAPON DAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.	149
FIGURA 4.37 - GRÁFICO DA CURVA ROC HTLV DAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS; (A) CORRESPONDE A ÁREA ABAIXO DA CURVA CALCULADA PELA ANÁLISE CURVA ROC	154
FIGURA 4.38 ANÁLISE DE COMBINAÇÃO ANTÍGENO + ANTÍGENO DE HTLV.	158
FIGURA 4.39 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO SÍFILIS P17 DAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.	159
FIGURA 4.40 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO SÍFILIS P47 DAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.	161
FIGURA 4.41 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO SÍFILIS TMPA DAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.	163
FIGURA 4.42 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO SÍFILIS P47 DAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.	165
FIGURA 4.43 - ANÁLISE DE COMBINAÇÃO ANTÍGENO + ANTÍGENO DE SÍFILIS COM OS PARÂMETROS UTILIZADOS PARA.....	166

FIGURA 4.44	RESULTADOS DOS ANTÍGENOS CHAGAS UTILIZADOS NO MULTITESTE.....	169
FIGURA 4.45	- RESULTADOS DOS ANTÍGENOS HBV UTILIZADOS NO MULTITESTE.....	170
FIGURA 4.46	- RESULTADOS DOS ANTÍGENOS HCV UTILIZADOS NO MULTITESTE.....	172
FIGURA 4.47	- RESULTADOS DOS ANTÍGENOS HIV UTILIZADOS NO MULTITESTE.....	174
FIGURA 4.48	- RESULTADOS DOS ANTÍGENOS HCV UTILIZADOS NO MULTITESTE PARA O HTLV1 GP21+GP46 A1) GRÁFICO DA ANÁLISE CURVA ROC COM UMA ÁREA ABAIXO DA CURVA DE 0.9030; B1) GRÁFICO SENSIBILIDADE X CUTOFF X ESPECIFICIDADE REPRESENTANDO O VALOR DE CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA CURVA ROC N=88 C1) SCATTER PLOT DAS MIF OBTIDAS DAS AMOSTRAS NEGATIVAS E POSITIVAS ANALISADAS E SUA RELAÇÃO COM O CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA ANÁLISE ROC MOSTRANDO O IC95% PARA HTLV ENV A2) GRÁFICO DA ANÁLISE CURVA ROC COM UMA ÁREA ABAIXO DA CURVA DE 0.8044; B2) GRÁFICO SENSIBILIDADE X CUTOFF X ESPECIFICIDADE REPRESENTANDO O VALOR DE CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA CURVA ROC N=162 C2) SCATTER PLOT DAS MIF OBTIDAS DAS AMOSTRAS NEGATIVAS E POSITIVAS ANALISADAS E SUA RELAÇÃO COM O CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA ANÁLISE ROC MOSTRANDO O IC95%	175
FIGURA 4.49	- RESULTADOS DOS ANTÍGENOS HTLV UTILIZADOS NO MULTITESTE PARA O HTLV GP21 A1) GRÁFICO DA ANÁLISE CURVA ROC COM UMA ÁREA ABAIXO DA CURVA DE 0.7761; B1) GRÁFICO SENSIBILIDADE X CUTOFF X ESPECIFICIDADE REPRESENTANDO O VALOR DE CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA CURVA ROC N=71 C1) SCATTER PLOT DAS MIF OBTIDAS DAS AMOSTRAS NEGATIVAS E POSITIVAS ANALISADAS E SUA RELAÇÃO COM O CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA ANÁLISE ROC MOSTRANDO O IC95% PARA HTLV GP21+GP46 A2) GRÁFICO	

DA ANÁLISE CURVA ROC COM UMA ÁREA ABAIXO DA CURVA DE 0.6192; B2) GRÁFICO SENSIBILIDADE X CUTOFF X ESPECIFICIDADE REPRESENTANDO O VALOR DE CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA CURVA ROC N=93 C2) SCATTER PLOT DAS MIF OBTIDAS DAS AMOSTRAS NEGATIVAS E POSITIVAS ANALISADAS E SUA RELAÇÃO COM O CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA ANÁLISE ROC MOSTRANDO O IC95%..... 177

FIGURA 4.50 - RESULTADOS DOS ANTÍGENOS SÍFILIS UTILIZADOS NO MULTITESTE PARA A SÍFILIS P17 A1) GRÁFICO DA ANÁLISE CURVA ROC COM UMA ÁREA ABAIXO DA CURVA DE 0.9977; B1) GRÁFICO SENSIBILIDADE X CUTOFF X ESPECIFICIDADE REPRESENTANDO O VALOR DE CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA CURVA ROC N=633 C1) SCATTER PLOT DAS MIF OBTIDAS DAS AMOSTRAS NEGATIVAS E POSITIVAS ANALISADAS E SUA RELAÇÃO COM O CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA ANÁLISE ROC MOSTRANDO O IC95% PARA SÍFILIS P47 A2) GRÁFICO DA ANÁLISE CURVA ROC COM UMA ÁREA ABAIXO DA CURVA DE 0.9996; B2) GRÁFICO SENSIBILIDADE X CUTOFF X ESPECIFICIDADE REPRESENTANDO O VALOR DE CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA CURVA ROC N=6295 C2) SCATTER PLOT DAS MIF OBTIDAS DAS AMOSTRAS NEGATIVAS E POSITIVAS ANALISADAS E SUA RELAÇÃO COM O CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA ANÁLISE ROC MOSTRANDO O IC95%..... 179

FIGURA 4.51 - RESULTADOS DOS ANTÍGENOS SÍFILIS UTILIZADOS NO MULTITESTE PARA O TPMA A1) GRÁFICO DA ANÁLISE CURVA ROC COM UMA ÁREA ABAIXO DA CURVA DE 0.9235; B1) GRÁFICO SENSIBILIDADE X CUTOFF X ESPECIFICIDADE REPRESENTANDO O VALOR DE CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA CURVA ROC N=162 C1) SCATTER PLOT DAS MIF OBTIDAS DAS AMOSTRAS NEGATIVAS E POSITIVAS ANALISADAS E SUA RELAÇÃO COM O CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA ANÁLISE ROC MOSTRANDO O IC95% 180

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	OS RISCOS ÀS DOENÇAS INFECCIOSAS	20
1.2	TRADUÇÃO DAS PESQUISAS EM AÇÕES	22
1.3	A TRANSFUSÃO SANGUÍNEA E A SUA SEGURANÇA	23
1.4	A DOENÇA DE CHAGAS	27
1.5	HBV	33
1.6	A HEPATITE C	39
1.7	AIDS E O HIV	44
1.8	HTLV	50
1.9	SÍFILIS	54
1.10	JUSTIFICATIVA	58
2	OBJETIVOS E METAS	61
2.1	OBJETIVO:	61
2.2	METAS:	61
3	MATERIAIS E MÉTODOS	62
3.1	MICRORGANISMOS E LINHAGEM CELULAR	62
3.2	PLASMÍDEO E VETOR DERIVADO DE BACTERÍOFAGOS	62
3.3	MEIOS DE CULTURA	62
3.4	SOLUÇÕES	62
3.5	IDENTIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS E ANTICORPOS PARA A UTILIZAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DO TESTE DIAGNÓSTICO	63
3.6	OBTENÇÕES DE PAINÉIS SOROLÓGICOS CARACTERIZADOS	63
3.7	AVALIAÇÃO DO IMPACTO DAS PROTEÍNAS DE <i>E.COLI</i> CONTIDAS NOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES NA PERFORMANCE DO ENSAIO	66
3.8	PRODUÇÃO DO LISADO DE <i>E.COLI</i>	66

3.9	LIGAÇÃO DO LISADO DE <i>E. COLI</i> AS MICROESFERAS	67
3.10	DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE ANTICORPOS ANTI-BACTERIA NO SOROS HUMANOS.....	67
3.11	IMUNOENSAIOS.....	68
3.12	OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO.....	68
3.13	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO ENSAIO.....	69
3.14	AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO DO TEMPO DE ENSAIO EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE MICROESFERAS	69
3.15	ACOPLAMENTO DOS ANTÍGENOS ÀS MICROESFERAS	70
3.16	CONTAGEM DAS MICROESFERAS ACOPLADAS	71
3.17	ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	72
3.18	SELEÇÃO DOS ANTÍGENOS	74
3.19	DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ACOPLAMENTO	74
4	RESULTADOS	75
4.1	ANTÍGENOS PROSPECTADOS.....	75
4.2	AVALIAÇÃO DA LIGAÇÃO INESPECÍFICA DA MICROESFERAS CONTRA OS ANTICORPOS DAS AMOSTRAS SOROLÓGICAS	78
4.3	ENSAIO MICROESFERA “ATIVADA” NÃO ACOPLADA COM USO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TAMPÃO 1%, 0,1% E SEM EXTRATO DE <i>E. COLI</i>	79
4.4	DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE ANTICORPOS ANTI-BACTERIA NOS SOROS HUMANOS.....	81
4.5	OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO PADRÃO.....	83
4.6	ACOPLAMENTOS DOS ANTÍGENOS PARA AS DOENÇA DE CHAGAS	87
4.7	ACOPLAMENTOS DOS ANTÍGENOS PARA HBV	100
4.8	ACOPLAMENTOS DOS ANTÍGENOS PARA HCV	118
4.9	ACOPLAMENTOS DOS ANTÍGENOS PARA HIV.....	126
4.9.1	Antígeno HIV-1 gag p17-p24, gp41-gp120.....	126

4.9.2 HIV1 env conj gp 39 HIV2	128
4.9.3 HIV BioM	130
4.9.4 HIV 2 GP36	132
4.9.5 HIV1 GP41	134
4.10 ACOPLAMENTOS DOS ANTÍGENOS PARA HTLV	140
4.11 ACOPLAMENTOS DOS ANTÍGENOS PARA SIFILIS.....	159
4.12 MULTITESTE.....	166
5 DISCUSSÃO.....	181
6 CONCLUSÕES.....	184
7 PERSPECTIVAS	185
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	186

1 INTRODUÇÃO

1.1 OS RISCOS ÀS DOENÇAS INFECCIOSAS

Apesar de todos os avanços tecnológicos, sociais e econômicos as doenças infecciosas continuam sendo a maior causa de mortalidade e morbidade mundial, sendo responsáveis por aproximadamente 25% das mortes anuais. Adicionalmente vale a pena salientar que mais de um bilhão de pessoas, um sexto da população mundial é afetada direta ou indiretamente por essas doenças (LOPEZ; MATHERS, 2006; O'CONNELL, 2007b).

Estas infecções obrigam os países a estar em constante alerta quanto ao seu progresso e a preocupar-se com a busca por métodos de vigilância e controles mais eficazes (GALLO, ROBERT C, 2002a; MEDLEY, 2001; MORENS *et al.*, 2004; URDEA *et al.*, 2006).

Vários fatores contribuem para esses números elevados de mortes e de risco de contaminação pelas doenças infecciosas, como o poder aquisitivo, educação, local da residência, sexo, comportamentos de risco, exclusão social, acesso à saúde e falta de recursos técnicos disponíveis (ADHIKARI; RUBENFELD, 2011a).

Os centros urbanos altamente povoados funcionam como verdadeiras incubadoras permitindo a adaptação, o surgimento ou ressurgimento de doenças infecciosas, mudando a epidemiologia destas com um impacto negativo na saúde global. Soma-se a este cenário a mobilidade atual das pessoas o que pode propiciar a disseminação destas doenças ao redor do mundo. Nesse contexto a alta taxa de contato entre indivíduos leva ao aumento da incidência de doenças respiratórias e por transmissão pessoa a pessoa, como influenza, sarampo, tuberculose e enteroviroses. O crescimento desordenado destes centros urbanos em alguns casos não permite o fornecimento adequado de água potável e saneamento aumentando a transmissão, por exemplo, de helmintos transmitidos pelo solo e de parasitas intestinais. Além do saneamento outros serviços podem ser insuficientes, como a

coleta de lixo, levando ao acúmulo deste e permitindo a reprodução de vetores como da dengue, febre amarela e leishmaniose (Figura 1.1) (ALIROL *et al.*, 2011a).

Como contraponto, as cidades oferecem melhores oportunidades de emprego e salários maiores que o ambiente rural, contribuem para o crescimento econômico e em geral tem um impacto positivo na redução da pobreza, assim como, oferecem melhores condições de acesso à saúde. A melhora no status socioeconômico desses indivíduos resulta em uma saúde individual melhor, estas pessoas também têm melhor acesso a campanhas para prevenção de doenças permitindo ainda uma melhor educação em saúde dessas pessoas (ALIROL *et al.*, 2011b).



FIGURA 1.1 - DIFERENÇAS SOCIOECONÔMICAS NOS CENTROS URBANOS, PARAISÓPOLIS, SÃO PAULO, BRASIL FONTE: (ALIROL *ET AL.*, 2011B)

As doenças infecciosas têm um grande impacto econômico e social afetando a qualidade de vida e a produtividade dos indivíduos infectados constituindo um obstáculo para o desenvolvimento socioeconômico dos países afetados por elas (HOPKINS *et al.*, 2007; KLING, 2006).

Um dos impactos econômicos mais proeminentes das doenças infecciosas, ligados ao contexto de alta densidade populacional, é a demanda imposta aos

sistemas de saúde e unidade de tratamento intensivo em um momento de surto infeccioso. As crises econômicas também são determinantes na proliferação das doenças infecciosas e na deterioração da saúde da população. Durante as crises econômicas, os planos de saúde privados se tornam menos acessíveis financeiramente aumentando a demanda por atendimento público. Assim como, a infraestrutura de saúde pública dos países se deteriora devido à aplicação do dinheiro destinado a saúde em outras áreas, tendo impacto direto no atendimento e na qualidade do mesmo (ADHIKARI; RUBENFELD, 2011b).

A melhora na capacidade de identificar, controlar e prevenir as doenças infecciosas é de interesse global sendo a vigilância epidemiológica chave para minimizar suas consequências sócias e econômicas (ALIROL *et al.*, 2011b).

1.2 TRADUÇÃO DAS PESQUISAS EM AÇÕES

Apesar de existir pesquisa básica de alta qualidade em doenças infecciosas, existe também uma falta de sucesso relativo na tradução dessas pesquisas em novos tratamentos e testes diagnósticos. A previsão de retorno financeiro pequeno de algumas destas pesquisas desencoraja as empresas farmacêuticas a investirem no combate a tais doenças, notadamente nas doenças negligenciadas. Vale ainda salientar que a cultura acadêmica que recompensa publicações e criação de conhecimento podem indiretamente aumentar a lacuna entre pesquisa e tratamento (BUTLER, 2007; O'CONNELL, 2007a).

No Brasil também não há falta de esforço científico. O número de artigos publicados, bem como, o número de pedidos de patentes, tem aumentado expressivamente ao longo dos anos. Porém, a proporção entre eles denota uma falta de tradução de pesquisa em serviços e produtos. A partir do ano de 2004 ocorreu uma mudança de paradigma das políticas públicas do governo brasileiro buscando diminuir a lacuna entre ciência e saúde pública através de iniciativas como a Lei da Inovação e a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia, que busca promover a inovação tecnológica para o desenvolvimento e aplicação de tecnologias nos sistemas e serviços de saúde (MOREL *et al.*, 2007).

A globalização mudou um velho paradigma estabelecido onde as doenças infecciosas inter relacionavam-se diretamente a pobreza devido ao não acesso à saúde. Desta forma a difusão de novas tecnologias e conhecimentos em saúde que ajudaram na melhora da saúde dos países desenvolvidos promoveram significativas melhorias também nos países em desenvolvimento. Porém, muitas dessas inovações foram fornecidas sem a transferência desse conhecimento e/ou da produção destes insumos e desta forma acabam por gerar um impacto econômico nestes países (DEATON, 2006; LABONTÉ *et al.*, 2011).

1.3 A TRANSFUSÃO SANGUÍNEA E A SUA SEGURANÇA

A metodologia de transfusão de sangue é considerada o maior avanço médico da primeira guerra mundial. Isto se deve a descoberta de seu potencial de salvar as vidas dos feridos em combate, este avanço dividiu-se em dois momentos, a transfusão direta de sangue sem a tipagem dos grupos sanguíneo (FIGURA 1.2), mesmo que resultando na morte de parte dos indivíduos por reação hemolítica aguda, e em um segundo momento onde se demonstrou que o sangue de doador universal podia ser guardado e utilizado com segurança sem provocar mortes (STANSBURY; HESS, 2009).



FIGURA 1.2 - REPRESENTAÇÃO DE TRANSFUSÃO DE SANGUE NO INICIO DO SÉCULO XX
(ALTER, H. J.; KLEIN, 2008)

As doenças transmitidas através da transfusão sempre foram uma preocupação. No século XX, a sífilis era o grande problema de saúde pública, sendo que a confirmação de que sua transmissão poderia ocorrer através de transfusão ficou demonstrada em 1941 com a publicação de 138 casos de sífilis transfusional (de Schryver A, Meheus A, 1990). Testes sorológicos para esta doença são realizados a mais de 70 anos, sendo o teste diagnóstico mais antigo aplicado para qualquer doença infecciosa (ORTON, 2001).

A preocupação com as doenças transfundidas pelo sangue se ampliou com o passar dos anos, inúmeros agentes infecciosos foram caracterizados quanto a sua capacidade de ser transmitidos através de transfusão de sangue contaminado. A (Figura 1.3) mostra a evolução da inclusão da detecção específica das principais doenças na avaliação sanguínea ao longo do tempo. Após o início da detecção da sífilis foram incorporadas na avaliação do sangue as seguintes doenças: a partir de 1970 iniciou-se a avaliação da presença do antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), em 1985 dos anticorpos para HIV, logo em 1986 iniciou-se a detecção da presença do anticorpo contra a proteína core da hepatite B (anti-HBc), em 1988 anticorpos para o vírus linfotrópico da célula T humana (HTLV-I), 1990 anticorpo para o vírus da hepatite C, anticorpos para HIV1 e HIV2 em 1992, antígeno p24 de HIV1 em 1996, e finalmente anticorpos para HTLV-I e II em 1998 (DOWNES; YOMTOVIAN, 2002; PERKINS; BUSCH, MICHAEL P, 2010a).

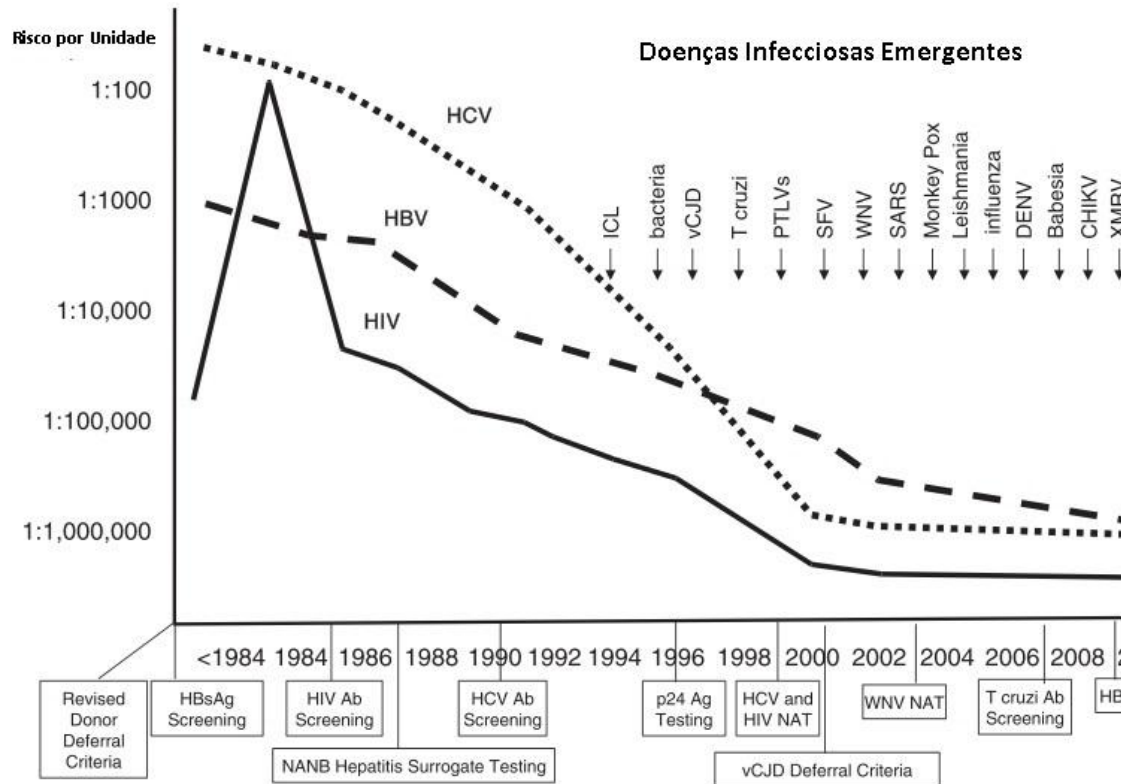


FIGURA 1.3 - INCORPORAÇÃO DOS TESTES DIAGNÓSTICOS PELO RISCO DE TRANSMISSÃO (PERKINS; BUSCH, MICHAEL P, 2010A)

O aumento do conhecimento a respeito dos agentes infecciosos como: a sua epidemiologia, suas formas de transmissão, seus sintomas, forma de prevenção, formas de tratamento, e a utilização de vacinas quando disponíveis induziram o desenvolvimento de testes diagnósticos mais sensíveis e específicos, aumentando a segurança transfusional. Além da expansão do painel de doenças sob avaliação diagnóstica do sangue doado. Outro fator que teve impacto positivo significativo na segurança transfusional foi a melhora na entrevista ao doador antes da doação e consequentemente, na triagem destes doadores denominados de grupos de risco ou com comportamento de risco (PERKINS; BUSCH, MICHAEL P, 2010b) .

Apesar de todas as melhorias implantadas, ainda existem casos de contaminação através de transfusão onde os vírus HBV, HCV e HIV são transmitidos mesmo com as bolsas testadas como negativo. Vários fatores foram apontados como prováveis causas desses resultados falsos negativos: janela imunológica (definida como o período entre a infecção e o início da detecção de antígenos e anticorpos do agente infeccioso por testes diagnósticos sorológicos); soro conversão

atípica (quando um paciente apresenta uma resposta imunológica diferenciada durante a infecção); novas variantes não incluídas nos testes (correspondem principalmente à introdução de novas espécies ou quasi espécies desses vírus através de indivíduos que viajaram para regiões endêmicas ou que imigraram destas regiões) e finalmente, os erros de laboratório (BUSCH, M P *et al.*, 2000a).

Logo se verificou que a maior parte das amostras que eram identificadas como soro conversão atípicas eram, em sua maioria, produto de contaminação de PCR ou então resultados falso-positivos de culturas negativas. Verificou-se também que os novos variantes eram muito raros e não tinham impacto significativo nas doações, assim como, os erros laboratoriais que apresentam uma frequência baixa, de aproximadamente 0,1%, mas quando somadas as outras possíveis causas aumentavam a possibilidade de transfundir as bolsas falso-negativas. Depois foi possível observar que o principal fator causador da não detecção dessas bolsas contaminadas era a doação do sangue durante a janela imunológica do doador. Quando os portadores de HIV e HBV doam sangue durante esse período o risco é de 90% de essas bolsas serem falso-negativas e para o HCV o risco é de 75%. Essa janela imunológica é de aproximadamente 56 dias para o HBV, 70 dias para o HCV e 22 dias para o HIV. Esses fatores quando combinados implicavam num risco de contaminação por transfusão para cada 1.000.000 de bolsas de 1,6 prováveis indivíduos infectados para HIV, de 9,1-11,1 para HCV indivíduos, de 6,6-15,3 para HBV e de 1,6 para HTLV totalizando 18,9-29 prováveis indivíduos infectados a cada 1.000.000 (BUSCH, M P *et al.*, 2000b).

Para tornar a transfusão mais segura os diretores da AABB (American Association of Blood Banks) criaram um comitê composto por membros da Cruz Vermelha, Conselho dos Bancos de Sangue Públicos, Fundação Nacional da Hemofilia, produtores de derivados de plasma, o FDA (Food and Drug Administration), o NIH (*National Institutes of Health*), o CDC (Center for Disease Control), e representantes da comunidade para determinar o protocolo de testes baseados em ácidos nucleicos, com o objetivo de diminuir a janela imunológica. Assim, foi introduzido o PCR em Tempo Real (qPCR) no ano de 2000 para HCV, em 2003 para HIV e em 2006 para HBV (BUSCH, M P *et al.*, 2000; PERKINS; BUSCH, MICHAEL P, 2010).

No setor público brasileiro as principais entidades responsáveis pelo controle e vigilância de doenças infecciosas são os Laboratórios Centrais (LACEN), os Laboratórios de Referência e os Hemocentros. Um exemplo de controle efetuado por estes últimos são os testes realizados para determinar se as bolsas de sangue serão liberadas ou não para transfusão. Neles, são analisados os seguintes patógenos: HIV1 e HIV2, HTLV1 e HTLV2, *Treponema pallidum*, HBV, HCV, e *Trypanosoma cruzi* (RDC 153/2003). Estas doenças são triadas por terem um grande impacto econômico e social.

Atualmente essa Triagem Sorológica do Sangue, é executada através de metodologias imunoenzimáticas (ELISA) automatizadas que, em sua maioria, apresentam boa sensibilidade, e testes baseados na metodologia de PCR em Tempo Real para o HIV e HCV com alta sensibilidade. Porém, os testes ELISA não são realizados de maneira multiteste o que torna as análises das bolsas de sangue trabalhosas e onerosas. Além disso, estes apresentam um custo elevado, pois são em sua maioria importados.

1.4 A DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, foi descoberta em 1909 por Carlos Chagas (Chagas, 1909). A presença deste parasita já foi detectada em mais de 150 espécies de 24 famílias de mamíferos, e é transmitido tipicamente para os humanos através das excretas do vetor triatomíneo, transfusão sanguínea ou transmissão congênita. Atualmente a transmissão oral vem ganhando importância epidemiológica existindo registros de transmissões através de alimentos onde o barbeiro contendo o parasita é processado juntamente com esses produtos (caldo de cada, açaí, polpas de suco entre outros). Apesar do *T. cruzi* poder infectar muitas células dos hospedeiros vertebrados (Mamíferos), em humanos, ele pode apresentar tropismo pelas fibras do músculo esquelético cardíaco e do esôfago (MOREL; LAZDINS, 2003). Estima-se que de 25 a 30% dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi* desenvolverão problemas cardíacos, neurológicos e/ou gastrointestinais irreversíveis, os quais resultarão em morte. Esta doença é a

quarta maior causadora de mortes por doenças infecciosas, sendo responsável por aproximadamente 50.000 mortes por ano e há cerca de 120 milhões de pessoas vivendo sob o risco de contaminação (OMS, 2010).

A doença de Chagas está distribuída nas Américas do Sul e Central, onde existem registros da sua presença em 18 países. Até pouco tempo esta doença era considerada um problema epidemiológico exclusivo dos países da América Latina, contudo já não é mais, visto que, a migração crescente das populações desses países para os EUA, por exemplo, aumentou o risco de transmissão desta doença por transfusão de sangue (BERN *et al.*, 2011; LEIBY *et al.*, 1999). No Brasil, a doença de Chagas é a principal causa de infarto em homens entre 20 e 40 anos. No período de 2000 a 2010, foram registrados no Brasil 1.086 casos de doença de Chagas aguda. Destes, 70% (765/1.086) foram por transmissão oral, 7% por transmissão vetorial (80/1.086), em 22% (234/1.086) não foi identificada a forma de transmissão (MS, 2012) e estima-se que no mundo 10 milhões de pessoas encontram-se infectadas com o *T. cruzi* (CLAYTON, 2010b; COURA, JOSÉ RODRIGUES; BORGES-PEREIRA, JOSÉ, 2010).

A infecção por transmissão vetorial por este parasita ocorre após a deposição do mesmo na pele machucada ou mucosa que estimula uma resposta inflamatória conhecida como chagoma de inoculação. Os tripomastigotas, forma infecciosa do parasita, são carregados pelos macrófagos para o fígado, baço, gânglios linfáticos e células musculares esqueléticas e cardíacas formando os pseudocistos que contêm a forma replicativa do parasita, denominada amastigotas. Com a ruptura desses pseudocistos no miocárdio, ocorre a miocardite aguda. Esta induz uma reação inflamatória e consequente destruição das células musculares e nervosas. Essa resposta é mantida pela presença do parasita, levando com o passar do tempo a uma reação de hipersensibilidade, dilatação e fibrose das células musculares, induzindo cardiopatia crônica, arritmias, megaesôfago e megacólon (CLAYTON, 2010a).

A doença apresenta duas fases: a fase aguda ou fase inicial e a fase crônica com suas formas indeterminada, cardíaca e digestiva. A fase aguda dura de 4 a 8 semanas, e se caracteriza pela presença detectável, através de testes de sangue diretos, do parasita livre na corrente sanguínea. Nesta fase da doença a maioria das

peessoas infectadas é assintomática e quando sintomática podem apresentar o sinal de romanha ou chagoma de inoculação, febre, adenopatia generalizada, edema, hepato esplenomegalia, miocardite e meninge encefalite nos casos mais graves, passado esse período, os indivíduos infectados entram na fase crônica da doença, chamado de estágio indeterminado, uma vez que estes não apresentam os sintomas e os sinais da doença de Chagas. Comumente, neste estágio os indivíduos apresentam eletrocardiogramas e radiografias de tórax, esôfago e colón normais, muito embora já apresentem positividade em testes diagnósticos tanto sorológicos como de ácidos nucleicos. A evolução para a forma crônica ocorre em apenas 20 a 30% dos indivíduos infectados num período de 5 a 15 anos após a infecção inicial. A forma clínica mais comum e significativa é a forma crônica cardíaca, a qual tem como sintomas arritmia, falha do coração, bloqueios atrioventriculares e tromboembolismo. A forma crônica digestiva se caracteriza pela destruição do plexo mesentérico levando ao surgimento do megacólon e/ou megaesôfago. Esta forma apresenta sintomas como disfagia, odinofagia, refluxo esofageal, perda de peso, aspiração, tosse e regurgitação (FIGURA 1.4). Aproximadamente 1% a 10% das mulheres grávidas com a doença crônica tem filhos com a doença congênita, e mesmo os bebês que não apresentam a doença apresentam um alto risco de mortalidade (COURA, JOSÉ RODRIGUES; BORGES-PEREIRA, JOSÉ, 2010; COURA, JOSÉ RODRIGUES, 2007b).

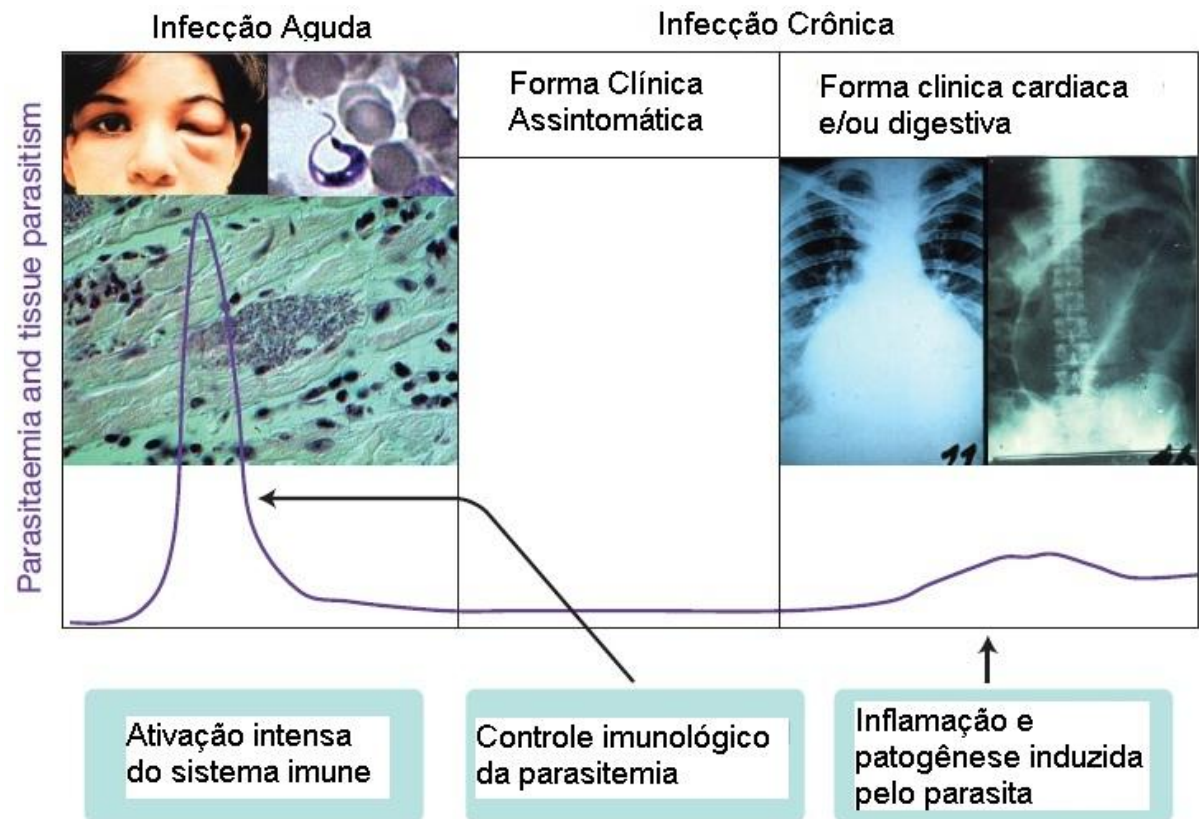


FIGURA 1.4 DINÂMICA DA PARASITEMIA E DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM RELAÇÃO À PARASITEMIA AO LONGO DO TEMPO DE INFECÇÃO POR *TRYPANOSOMA CRUZI* (JUNQUEIRA ET AL., 2010)

Existem duas drogas para o tratamento da doença de Chagas: o benzonidazol e o nifurtimox. O benzonidazol, introduzido em 1971, é um derivado do nitroimidazol e atua contra as formas tripomastigota e amastigota. Normalmente é utilizado como tratamento na fase aguda da infecção e é a droga melhor tolerada pelo doente. O nifurtimox, introduzido em 1965, é um composto de nitrofurado também com atividade contra os tripomastigotas e amastigotas (BERN, 2011; GUEDES *et al.*, 2011). As duas opções de tratamento apresentam efeitos colaterais significativos, como distúrbios gastrointestinais, perda de peso, náusea, vômitos e desconforto abdominal. Podem ocorrer também sintomas ligados ao sistema nervoso central como irritabilidade, insônia, desorientação e tremores. Sintomas mais graves, mas menos frequentes são parestesia, polineuropatia e neurite periférica, tonturas e vertigens, ansiedade, mudanças de humor e mialgias. As duas drogas são mutagênicas e aumentam o risco de leucemias e neoplasias. Não existem drogas específicas para a fase crônica da doença e o tratamento

recomendado é o mesmo que o da fase aguda da doença (ASTELBAUER; WALOCHNIK, 2011).

A prevenção da transmissão através do desenvolvimento de métodos eficazes de controle e diagnóstico são de importância chave no controle do número de infecções (COURA, JOSÉ RODRIGUES, 2007a; OELEMANN, W. M. *et al.*, 1998). O diagnóstico para a doença de Chagas é realizado por diferentes técnicas de acordo com a fase da doença. Técnicas diretas de detecção de parasitas são usadas na fase aguda, a qual é caracterizada por altas taxas de parasitas no sangue de indivíduos infectados. Já na fase crônica, cuja presença de parasitas no sangue é rara, o diagnóstico é realizado por métodos indiretos que detectam a resposta imune específica contra antígenos de *T. cruzi* (LÓPEZ-ANTUÑANO, 1997).

Através da varredura de biblioteca de cDNA das formas epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi* foram isolados muitos antígenos com relevância diagnóstica por diferentes laboratórios. Isto resultou em várias sequências homologas, porém com nomes diferentes. Muitos desses genes isolados de diferentes cepas apresentam repetições em tandem, com extrema similaridade entre si, indicando que estes genes são altamente conservados. Os antígenos FRA, Ag1, JL1 e H49 são constituídos de repetições de 68 aminoácidos conservados entre as cepas de *T. cruzi*. Outras proteínas não repetitivas foram encontradas pela mesma metodologia como a proteína ribossomal P JL5, o antígeno flagelar de 24kDa (FCaPB, 1F8, Tc-24, Tc-28, A13, Tc40), proteínas de choque térmico, proteínas associadas ao flagelo (FL-160, CEA, CRP) e ubiquitina (SILVEIRA, DA *et al.*, 2001a).

Vários estudos foram realizados para determinar o desempenho desses antígenos em relação à sua capacidade diagnóstica. Estes estudos chegaram a conclusões importantes, os antígenos apesar de conterem praticamente a mesma sequência obtiveram índice Kappa (KI) diferentes CRA (KI = 100), B13 (KI = 0.96) e H49 (KI = 0.92), indicando que essas diferenças podem ter ocorrido devido à metodologia de purificação utilizada e tipo de imunoensaio. Em um segundo estudo, dez antígenos recombinantes tiveram seu desempenho avaliado (Ag2, Ag13, SAPA, H49, A13, JL5, JL7, JL8, JL9 e RAI), os antígenos JL7, H49, Ag2 e A13 foram os que obtiveram melhor desempenho com KI = 0.92 – 0.93, porém não foram capazes

de detectar a presença de anticorpos na fase crônica da doença, sugerindo que para o diagnóstico da doença de Chagas se faz necessário à utilização de mais de um antígeno. Em outro estudo seis antígenos foram avaliados (H49, JL7, JL8, A13, B13 e 1F8), o resultado obtido mostrou que estes obtiveram uma alta sensibilidade variando de 93.4% a 99%. Outro resultado importante é que os pacientes crônicos possuem anticorpos contra os antígenos não repetitivos de *T.cruzi*, isso devido ao resultado obtido de 99% de sensibilidade e 99.6% de especificidade do antígeno 1F8. A combinação dos peptídeos H49 ou JL7, B13 e 1F8 obtiveram um valor calculado de 100% de sensibilidade e 100% de especificidade, além disso não foram observadas reação cruzada com outros tripanosomatídeos (SILVEIRA, DA *et al.*, 2001b).

Os métodos sorológicos utilizados atualmente para o diagnóstico da doença apresentam graus variáveis de sensibilidade e especificidade. Dentre estes métodos os mais comumente utilizados devido a sua simplicidade, custo baixo e bom desempenho em termos de sensibilidade e especificidade são a hemaglutinação indireta (HAI), a imunofluorescência indireta (IFI) e os métodos imunoenzimáticos (ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*). Estes utilizam antígenos (naturais e recombinantes) para detectar a presença de anticorpos circulantes no soro dos pacientes. A OMS (Organização Mundial da Saúde) recomenda a utilização de dois testes para confirmar a doença. Os testes diagnósticos atuais são capazes de detectar 98% dos casos, contudo, estes apresentam alta variabilidade na reprodutibilidade e confiabilidade em virtude da baixa padronização dos reagentes. Estes testes podem ainda apresentar reação cruzada com outros protozoários, principalmente, do gênero *Leishmania* sp (GOMES, Y M *et al.*, 2001; GOMES, YARA M *et al.*, 2009), levando a um erro de diagnóstico e, conseqüentemente, de tratamento. Estes testes também são suscetíveis a resultados falso negativos, devido aos diferentes níveis de resposta imunológica verificada nos diferentes estágios da doença. Em alguns casos as amostras positivas fracas não diferem das amostras negativas.

O diagnóstico é importante para que seja possível diferenciar a doença de Chagas de outras infecções que apresentam sintomas semelhantes, e ainda, para que o tratamento possa ser iniciado, aumentando, assim, a expectativa de vida do chagásico. Desta forma, denota-se a necessidade e importância do desenvolvimento

dos kits diagnósticos para a Doença de Chagas com melhores antígenos a fim de aumentar a sensibilidade e a especificidade (DIAS; SCHOFIELD, 1998).

1.5 HBV

Após a segunda guerra mundial estudos começaram a tentar diferenciar as causas das hepatites agudas. Em 1967 Krugman et al. identificaram que havia ao menos duas hepatites, sendo uma destas transmitidas sexualmente, denominada posteriormente com a identificação do antígeno de superfície (HBsAg) Hepatite B. (GANEM; PRINCE, A. M., 2004a).

O vírus da Hepatite B (HBV) pertence à família dos vírus hepato trópicos denominados Hepadnaviridae que infectam principalmente hepatócitos. A partícula viral do HBV tem diâmetro médio de 42nm, é composta por duas camadas, a camada externa correspondente ao envelope contêm três glicoproteínas, dentro do envelope está contido o nucleocapsídeo contendo a DNA polimerase e o genoma viral. Este é representado por uma fita de DNA simples com 3,2 kb contendo também algumas regiões em dupla fita (GANEM; PRINCE, A. M., 2004b).

O resultado do sequenciamento destes vírus ao redor do mundo mostrou que existe uma grande variedade de genótipos com uma distribuição geográfica associada (GANEM; PRINCE, A. M., 2004b). O HBV possui sete genótipos principais indicados de A até H, estes se distribuem da seguinte forma: genótipo A é pandêmico, os genótipos B e C são encontrados na Ásia, o genótipo D é encontrado na Europa, o genótipo E na África, o genótipo F nos Estados Unidos da América (EUA), o genótipo G nos EUA e França e o genótipo H é encontrado na América Central. A divergência de sequência entre os genomas é baixa, em torno de 8% (SITNIK et al., 2004). Na América do Sul predomina o genótipo “A”, principalmente no Brasil devido a imigração africana (PARANÁ et al, 2009).

A expressão das proteínas virais acontece através da transcrição das quatro regiões abertas de leitura contidas no genoma viral. A região Pre-S codifica os três antígenos de superfície, destas a proteína mais abundante é o HBsAg que pode

peessoas infectadas pelo vírus, o que representa quase 30% da população mundial. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, 800 mil pessoas já tiveram, em algum momento da sua vida, infecção pelo vírus da hepatite B (Portal da Saúde - 2011).

A contaminação pelo HBV pode ser via percutânea, sexual ou perinatal. De forma geral, a principal via de contaminação é por transmissão vertical entre o feto e a mãe. A progressão da infecção aguda para crônica é influenciada pela idade do paciente, a idade também é determinante da prevalência da infecção.

Quando a contaminação ocorre pela via perinatal o sistema imune do hospedeiro não consegue diferenciar as suas células das partículas virais tornando o organismo imunotolerante a presença do vírus, assim a resposta celular à presença dos antígenos nas membranas dos hepatócitos não ocorre, logo se estabelece uma infecção crônica profunda e para toda vida se estabelece em aproximadamente 90% das pessoas infectadas por esta via.

Já nos hospedeiros que tem esta infecção na adolescência e início da idade adulta através de transmissão sexual ou contato com sangue contaminado, ocorre uma forte resposta celular aos antígenos de HBV expressos nos hepatócitos resultando na infecção aguda e cura, essa resposta em apenas 1% dos contaminados não é capaz de eliminar os vírus (FIGURA1.6) (DIENSTAG, 2008b).

Os hospedeiros crônicos em muitos casos são assintomáticos e apresentam lesões hepáticas mínimas mesmo com replicação viral ocorrendo, sugerindo que a replicação do HBV nos hepatócitos não é a causa direta da morte dessas células. Acredita-se que a resposta imunológica aos hepatócitos infectados seja a principal causa das lesões hepáticas. A resposta imune ao HBV e o papel dessa resposta na doença ainda não estão completamente entendidos (LAI *et al.*, 2003b).

A infecção crônica do HBV tem três fases, a primeira se caracteriza por uma longa imunotolerância, com praticamente nenhuma lesão hepática, e altas concentrações de DNA HBV e positividade para a HBeAg; em seguida a fase de clearance imunológico marcada pela ausência do HBeAg e presença do anticorpo Anti-HBeAg, esta fase é acompanhada por inflamação, fibrose e concentrações flutuante de alanina transaminase e finalmente a fase residual com baixas concentrações de HBV DNA e concentrações normais de alanina transaminase. Nos

indivíduos que a adquiriram o vírus durante a infância e adolescência a resposta pula direto para a fase clearance, não existe a fase de imunotolerância. Já os indivíduos que adquiriram o vírus durante o período neonatal ou início da infância em muitos casos não ocorre o clearance imunológico e a doença continua a progredir (FIGURA 1.6) (LAI *et al.*, 2003b).

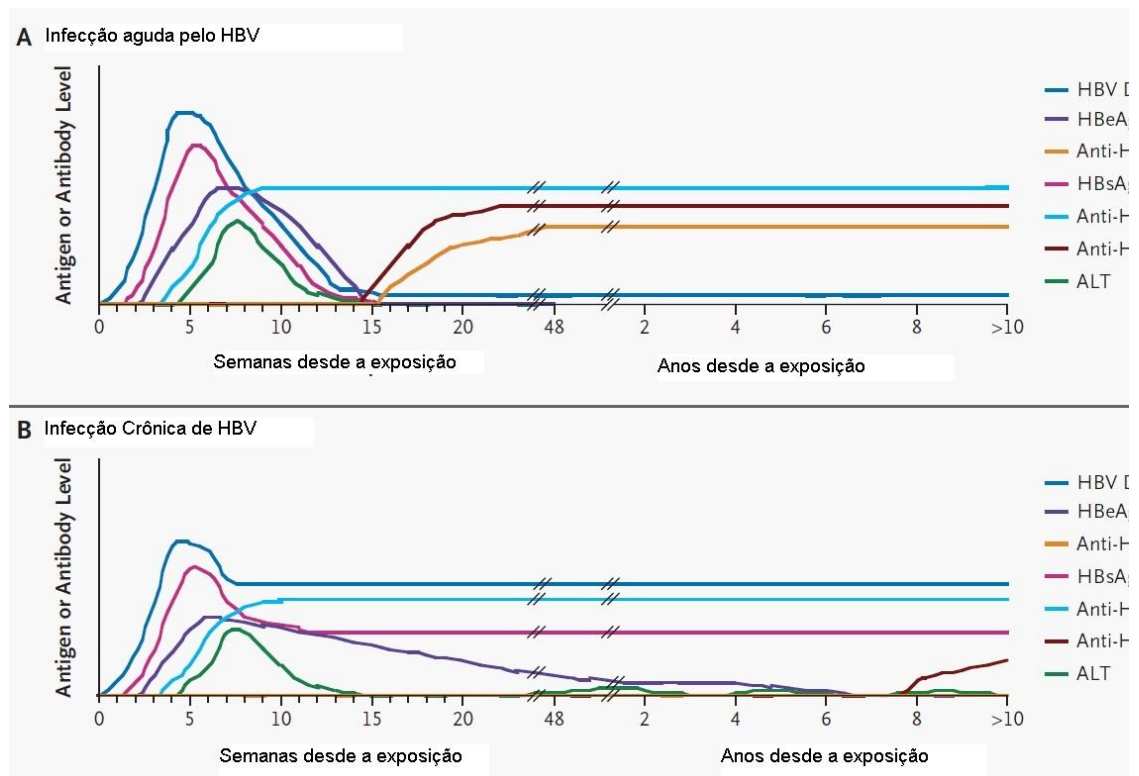


FIGURA 1.6 – ANTICORPOS E ANTÍGENOS CIRCULANTES NAS FASES DA INFECÇÃO POR HBV, REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS DOIS PERFIS DE INFECÇÃO POR HBV, SEUS NÍVEIS DE ANTÍGENOS E ANTICORPOS ATRAVÉS DO TEMPO, (A) ESTÃO REPRESENTADOS O NÍVEIS DOS ANTÍGENOS E ANTICORPOS DA INFECÇÃO AGUDA (B) ESTÃO REPRESENTADOS O NÍVEIS DOS ANTÍGENOS E ANTICORPOS DA INFECÇÃO CRÔNICA (GANEM; PRINCE, A. M., 2004B)

Quando o HBV replica nos hepatócitos produz HBsAg em quantidades no mínimo mil vezes superiores as partículas virais produzidas simultaneamente, estas são processadas pelas células apresentadoras de antígenos, que apresentadas em proteínas de membrana MHC1 ou MHC2, logo são reconhecidas por células T citotóxicas CD4+ ou CD8+ sensibilizando estas células. A célula T citotóxica CD8+

sensibilizada pode reconhecer os antígenos apresentados pelos hepatócitos. Esse reconhecimento pode fazer com que a célula T CD8+ induza a lise do hepatócito ou que este libere interferon-gama e $\text{TNF}\alpha$ que diminuem a replicação viral das células vizinhas (FIGURA 1.7) (GANEM; PRINCE, A. M., 2004b).

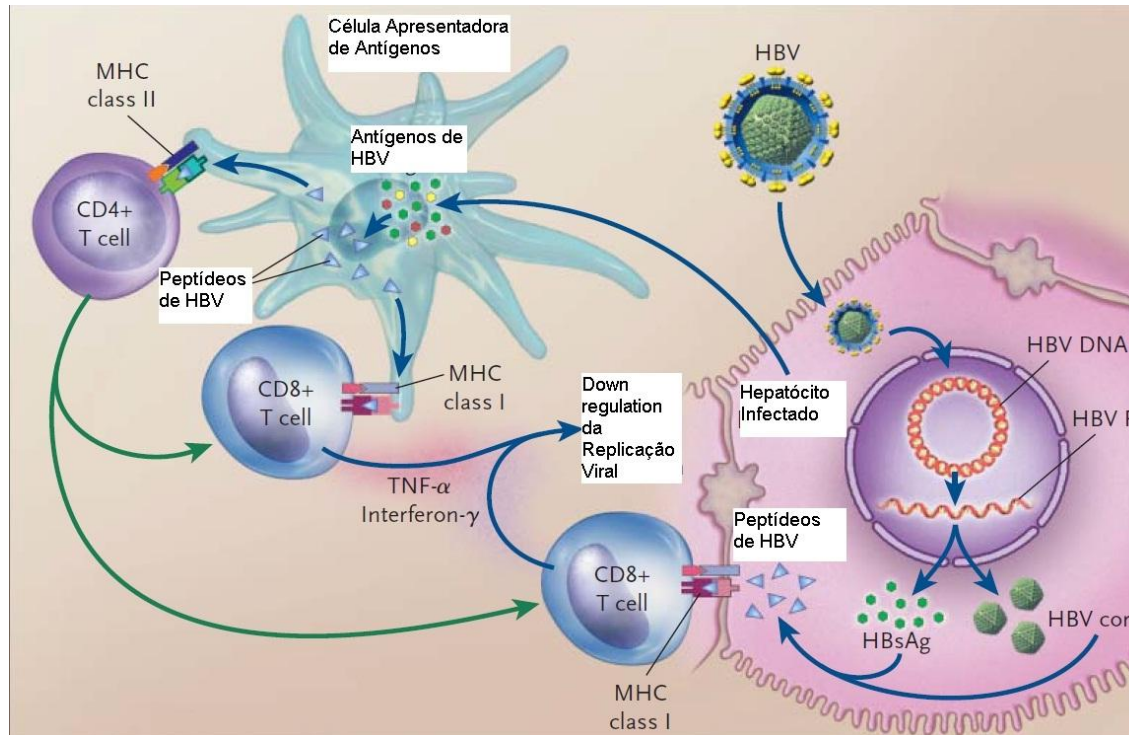


FIGURA 1.7 – RESPOSTA IMUNOLÓGICA AO HBV MOSTRANDO A INTERAÇÃO DAS CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENO COM HEPATÓCITOS E OS LINFÓCITOS CD4+ E CD8+ NO COMBATE AO HBV (GANEM; PRINCE, A. M., 2004B)

Os primeiros sintomas da doença são perceptíveis após um período de 45 a 180 dias de incubação do vírus. A partir daí, os indivíduos desenvolvem um quadro de hepatite aguda, apresentando sintomas subclínicos e anictéricos. Dos que apresentam a fase aguda, metade desenvolvem sinais de atividade inflamatória no fígado, podendo ou não desenvolver cirrose e carcinomas hepatocelulares (MARCO, DI *et al.*, 1999).

Atualmente, o diagnóstico da hepatite B é realizado por técnicas sorológicas e técnicas de detecção de ácidos nucleicos. A metodologia de análise sorológica

padrão baseia-se em testes imunoenzimáticos do tipo ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*), que utilizam antígenos (naturais e recombinantes) para detectar a presença dos antígenos HBsAg, HBcAg e HBeAg ou dos anticorpos anti-HBs, anti-HBc, anti-Hbe circulantes no soro dos pacientes. Os Testes de Ácidos Nucleicos (NAT) são majoritariamente baseados em PCR em Tempo Real (qPCR), cujos iniciadores e sondas são desenhados para detectar as regiões “estruturais e não estruturais” do vírus. Ambas metodologias de testes são suscetíveis a resultados falso negativos, devido aos diferentes níveis de resposta imunológica e presença dos marcadores das doenças que variam conforme os diferentes estágios da doença. Em alguns casos as amostras positivas fracas não diferem das amostras negativas. Quando o antígeno HBs persiste no soro por mais de seis meses, os pacientes são considerados portadores crônicos da doença. A infecção crônica é caracterizada pela cirrose hepática de forma oligo ou assintomática, com grande risco de desenvolver hepatocarcinoma (CAMARGO *et al.*, 1986; HOOFNAGLE; BISCEGLIE, DI, 1991).

A terapia antiviral tem como objetivo melhorar a condição dos pacientes cronicamente infectados evitando a progressão da doença transformando as lesões hepáticas em cirrose, cirrose descompensada, estágio final da doença do fígado, carcinoma hepatocelular e morte. O objetivo das terapias atuais é a supressão da replicação viral reduzindo a atividade histológica e permitindo uma remissão bioquímica. Assim, estratégia de tratamento atual tem diferentes objetivos para cada um dos três grupos perfil sorológicos estabelecidos: grupo 1 – Pacientes HbeAg positivos e negativos, tem como objetivo uma perda substancial do HBsAg com ou sem a soro conversão do Anti-HBsAg; grupo 2 – Em pacientes HBeAg positivo, uma soro conversão duradoura é o objetivo e para o grupo 3 – Nos pacientes HBeAg positivos que não conseguem atingir uma soro conversão Anti-HBeAg, uma manutenção baixa de número de cópias de DNA viral quando tratados com análogos de nucleotídeos ou após tratamento com interferon α no mês seguinte é o objetivo desejável (EASL, 2009).

Existem duas formas de tratamento para a Hepatite B uma através da imuno modulação com a utilização de interferon- α , e IFN- α peguilado (pegIFN- α), que induz a resistência antiviral em tecidos não infectados e a outra visando a supressão viral através da utilização de análogos de nucleosídeos como lamivudina, adefovir,

entecavir, telbivudina e tenofovir. Além destas opções de tratamento o transplante hepático deve ser considerado em pacientes que não respondem ao tratamento (LAI *et al.*, 2003b).

1.6 A HEPATITE C

No início dos anos 80 além do HIV havia outro agente infeccioso que também era transmitido pelos usuários de drogas intravenosas e receptores de doações de sangue. Este muitas vezes não causava nenhum desconforto às vítimas por muitos anos, apresentam sintomas como febre e fadiga; e nesse interim discretamente tem o fígado comprometido, resultando muitas vezes em cirrose e câncer. Este agente infeccioso foi identificado em 1989, era o vírus da hepatite C (HCV) (GRAVITZ, 2011). Estima-se que 130-210 milhões de pessoas estejam infectadas em todo mundo pelo HCV, ocorrendo cerca de 3 a 4 milhões de novas infecções a cada ano sendo que aproximadamente 350.000 mortes anuais podem ser relacionadas ao HCV (PERZ *et al.*, 2006; OMS, 2007).

O vírus da hepatite C é membro do gênero *Hepacivirus* pertencente à família Flaviviridae, o gênero é dividido em seis genótipos principais e mais de 80 sub-genótipos, estes tem origem na África e Ásia, e alguns se disseminaram pelo mundo sendo os genótipos 1a e 1b os subtipos mais prevalentes. O genótipo 3a é prevalente nos usuários de drogas na Europa. O genótipo 4 no norte e meio leste da África. O genótipo 5 é encontrado no sul da África, e o genótipo 6 no sudeste da Ásia. As sequências nucleotídicas dos genótipos diferem entre si em média em 32%, e dos subtipos em 25%. A classificação é baseada nas regiões que codificam para as proteínas CORE, E1 e NS5B. As regiões que apresentam maior conservação nucleotídica são a região 5' não traduzida e os 99 pares de base da região 3' não traduzida. A região hiper-variável do gene E2 é a região mais variável do genoma do vírus (SIMMONDS *et al.*, 2005a).

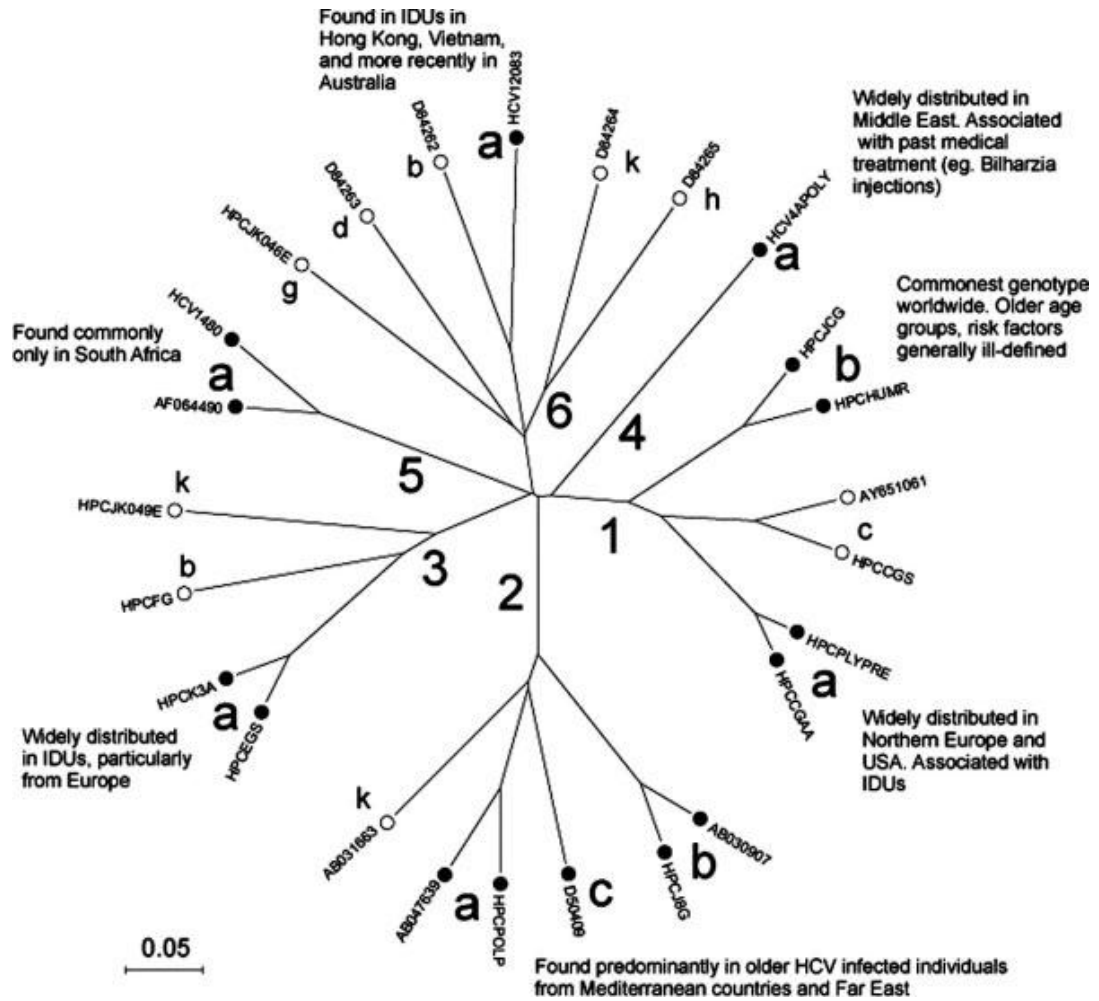


FIGURA 1.7 - ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS GENÓTIPOS DE HCV, ÁRVORE FILOGENÉTICA DOS PRINCIPAIS GENÓTIPOS DO HCV E SUA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA (SIMMONDS ET AL., 2005B)

O HCV é um vírus de 60nm esférico envolto por envelope, internamente ao envelope viral existe um nucleocapsídeo que envolve uma simples fita de RNA positiva com aproximadamente 9,6kb. O genoma do HCV é replicado no citoplasma dos hepatócitos, e está organizado em uma única ORF que codifica uma única poliproteína com 3010 aa que é processada pelas proteases virais e da célula hospedeira em dez proteínas diferentes, CORE, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B. As proteínas não estruturais são clivadas da poliproteína pelas proteases virais NS2-3 e NS3-4, enquanto as proteínas estruturais são clivadas dentro do RER pelas peptidases sinais (SEEGER; MASON, 2000a).

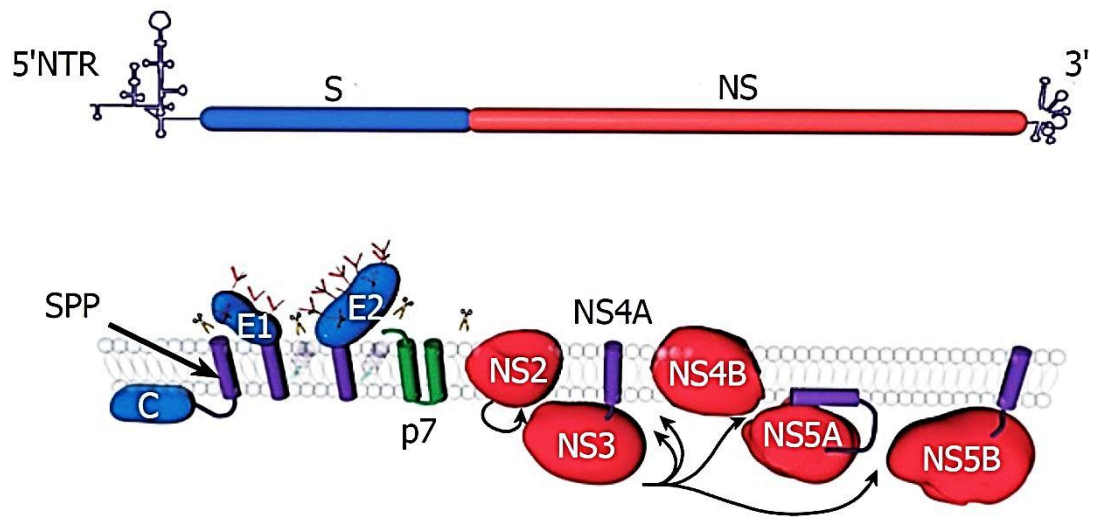


FIGURA 1.8 – ORGANIZAÇÃO GENÔMICA E DA POLI PROTEÍNA DE HCV, NA PARTE DE CIMA O GENOMA DO HCV COM AS REGIÕES ESTRUTURAIS NÃO TRADUZIDAS 5' E 3, REGIÃO S ONDE ESTÃO OS GENES DAS PROTEÍNAS ESTRUTURAIS E REGIÃO NS ONDE ESTÃO OS GENES PARA AS PROTEÍNAS NÃO ESTRUTURAIS. NA PARTE INFERIOR A REPRESENTAÇÃO DAS PROTEÍNAS NO RETICULO ENDOPLASMÁTICO RUGOSO, COM SEUS DOMÍNIOS, A TESOURA INDICA O LOCAL DE CLIVAGEM DAS PEPTIDASES SINAL. (DUBUISSON, 2007B)

A proteína CORE é uma proteína multifuncional ligadora de RNA. Ela forma o núcleo capsídeo viral e é processada no retículo endoplasmático pelas proteases dos hepatócitos, esta proteína pode ser dividida em dois domínios: um N-terminal hidrofílico (D1) onde estão contidos aminoácidos carregados positivamente e um C-terminal hidrofóbico (D2) responsável pelo dobramento correto de D1 e interação do core com a membrana. Esta proteína tem sido indicada como causadora da esteatose e oncogênese hepatocelular. As glicoproteínas do envelope E1 e E2 são proteínas estruturais da partícula viral e são essenciais para a ligação à célula e invasão celular pelo vírus. Estas também são processadas pelas proteases do hospedeiro, no retículo os ectodomínios das duas proteínas são altamente glicosilados com a ligação de N-glicanos. Na proteína E2 foi identificada uma região hiper variável cuja variabilidade é dirigida pela seleção dos anticorpos das variantes que escapam ao sistema imune (DUBUISSON, 2007a).

As proteínas não estruturais p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B são necessárias para a replicação do genoma viral. A proteína não estrutural, P7, pertence a uma família de proteínas virais chamados como vioporinas que formam canais iônicos, necessários para a produção de partículas virais infecciosas. A p7 é uma pequena proteína com 63 aminoácidos, posicionado na junção das proteínas estruturais e não estruturais. A proteína não estrutural 2 (NS2) é um cisteína protease de 23-kDa hidrofóbica transmembranar. A associação a membrana da NS2 é p7-independente e ocorre co-traducionalmente. NS3 é uma proteína multifuncional com um domínio N-terminal serina protease e um domínio C-terminal associado a função RNA helicase/NTPase. A atividade protease NS3 é realçada pelo cofator NS4A. Somado ao seu papel no processamento da poli proteína, a atividade da protease NS3-4A está também envolvida em bloquear a capacidade da célula hospedeira em montar uma resposta inata antiviral. A porção N-terminal da NS4A é responsável pela associação a membrana do complexo de NS3-4A. A proteína NS4B é um polipeptídeo altamente hidrofóbico de 27-kDa, encontra-se na membrana do RE e parece ser essencial para a replicação de HCV. Já a proteína não estrutural NS5A tem atividade de ligação a RNA e encontra-se ancorada à membrana do ER. A proteína não estrutural NS5B é uma RNA polimerase RNA dependente (RDRP) responsável pela síntese do genoma viral. NS5B não possui a função de *proofreading* gerando populações com uma grande taxa de mutantes (DIENSTAG, 2008a; PENIN *et al.*, 2004; SHARMA, 2010).

A transmissão do HCV ocorre pelo contato com sangue contaminado principalmente via transfusão, agulhas compartilhadas e ocorre raramente de mãe para filho (ALTER, M. J. *et al.*, 1992; OHTO *et al.*, 1994). A infecção aguda pelo HCV em sua maioria é assintomática e quando sintomática são comuns náusea, mal-estar e icterícia. Em média em 70% dos casos o sistema imunológico falha em erradicar a infecção, isto é influenciado pela rota de transmissão, presença de sintomas e a idade em que ocorreu a transmissão, além dos genótipos do hospedeiro associados ao gene codificador para IL 28. A infecção crônica esta associada com graus variados de inflamação e fibrose do tecido hepático, e é independente do genótipo e da carga viral. Em aproximadamente 30% destes casos os pacientes portadores da infecção crônica vão desenvolver cirrose hepática após 20 a 30 anos de infecção (IKEDA *et al.*, 1998).

O diagnóstico da infecção pelo HCV baseia-se em testes para a detecção de anticorpos formados contra o vírus (SCHEIBLAUER *et al.*, 2006), e pela detecção do RNA do vírus através de métodos moleculares, principalmente por qPCR, detecção essencial para a gestão do tratamento da doença. Esta técnica consegue detectar até 10 UI/ml (unidades internacionais por ml) e quantificar com precisão até aproximadamente 10^7 UI/ml. Embora esses sejam métodos muito sensíveis para rastreamento de soropositivos para HCV e tenham quase que eliminado a ocorrência de hepatite pós-transfusional, seu resultado pode mostrar-se falso-negativo (ZACHARY *et al.*, 2005; ZEIN *et al.*, 1997). A variabilidade genética entre os diversos subtipos virais circulantes vem sendo discutida como a possível causa deste resultado, o que poderia ser um fator limitante na utilização de um mesmo teste em diferentes regiões geográficas. Outro componente importante na infecção pelo HCV são os polimorfismos encontrados a jusante do gene IL28B (interferon lambda 3) do hospedeiro humano, esses estão ligados a resposta ao tratamento com interferon-alfa peguilado em conjunto com ribavirina, também estão associados como mencionado ao clearance espontâneo na infecção aguda (FUKUHARA *et al.*, 2010; TANAKA, Y. *et al.*, 2009).

Infelizmente, não existem vacinas disponíveis para a prevenção do HCV. Porém, existe tratamento disponível. Este tem como objetivo primário curar a infecção, ou seja, eliminar quaisquer traços de HCV circulante ao término do tratamento, para tanto, padroniza-se que os níveis de RNA devem estar mais baixos que (<50 UI/ml) 24 semanas após o término do tratamento. O tratamento com a combinação de interferon peguilado (IFN)- α e ribavirina é aprovado e aceito como tratamento padrão para a hepatite C crônica (EASL, 2011).

Duas novas drogas com grande potencial terapêutico foram aprovadas pelo FDA em maio de 2011, telaprevir e boceprevir, estas inibem a ação da serina protease NS3/4A essencial para a replicação do HCV. A sua utilização deve ser em combinação com o interferon-alfa peguilado e a ribavirina para o tratamento do genótipo 1 de HCV em pacientes adultos com a doença crônica, com cirrose, incluindo os doentes que nunca fizeram tratamento ou que já realizaram o tratamento prévio baseado com interferon (TUNGOL *et al.*, 2011).

1.7 AIDS E O HIV

Em 1981, nos EUA, clínicos identificaram uma nova doença que tinha como principal característica a diminuição das células de defesa T CD4+. No ano seguinte, o CDC indicou que esta nova doença era provavelmente infecciosa ao mesmo tempo que também foi confirmado a presença desta doença em outros países. Nesse mesmo ano, Gallo & Essex sugeriram que esta era causada por um retrovírus ainda não descrito da família do HTLV. A primeira descrição desse novo retrovírus foi apresentada em 1983 por pesquisadores franceses, mas ainda sem uma comprovação direta deste vírus com a AIDS (BARRÉ-SINOUSSE *et al.*, 1983). Em maio de 1984 uma série de artigos foi publicada pelo grupo de Robert Gallo descrevendo a produção de células T CD4+, como isolar e crescer continuamente o vírus, também a caracterização de algumas proteínas estruturais, o desenvolvimento do teste diagnóstico e evidências do novo vírus como o causador da nova epidemia. Nesse período também foram desenvolvidas as técnicas de cultivo celular e que permitiram o teste de drogas, como a zidovudina (AZT) (GALLO, ROBERT C, 2002b).

A velocidade e intensidade do conhecimento gerado sobre o HIV nos anos de 1984 e 1985 é impressionante, nesse período foram descritos os genes do vírus HIV através de sequenciamento dos genomas isolados virais, o receptor utilizado pelo vírus nas células CD4+, a capacidade do vírus em infectar macrófagos, a forte resposta imune primária no início da infecção, mecanismos de evitar o contágio e finalmente, que a infecção ocorre de forma lenta, progressivamente causando o declínio das células CD4+ permitindo o surgimento de infecções oportunistas e neoplasias, que levam a morte do hospedeiro.

Até 2011 não importava a forma do tratamento, a erradicação do vírus não acontecia, já em 2011 um paciente reincidente de câncer de medula e portador do vírus da AIDS realizou um tratamento para transplante de medula e é considerado até então o único paciente curado do vírus da AIDS (ALLERS *et al.*, 2011; HÜTTER; GANEPOLA, 2011).

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um lentivírus, pertencente a família retroviridae, como todos os retrovírus o vírus HIV tem um genoma simples fita de RNA positiva com um tamanho aproximadamente de 10kb. Este genoma ao ser liberado no interior da célula é transformado em DNA dupla fita, pela transcriptase reversa que acompanha o genoma dentro da partícula viral, o produto da transcriptase reversa pode ser inserido no genoma da célula hospedeira, que depende de outra enzima viral a integrase e de cofatores do hospedeiro (SMITH, J. A.; DANIEL, 2006). A infecção pelo HIV em humanos é considerada uma pandemia pela Organização Mundial de Saúde (OMS), infectando cerca de 1% da população mundial. Em 2008, existiam 33,4 milhões de pessoas vivendo com HIV, ocorreram 2,7 milhões de casos novos e 2 milhões de mortes relacionadas a AIDS (OMS, 2008).

Existem dois tipos de vírus HIV, o HIV1 é o causador da maior parte das infecções mundiais, esta tem origem em uma provável transferência zoonótica de um primata superior o chimpanzé (*Pan troglodytes troglodytes*) para os seres humanos. Este vírus tem uma alta capacidade de replicação, mutação e diversificação. As análises filogenéticas definiram um grupo principal M, que contém os outros subtipos - A, B, C, D, F1, F2, G, H, J, e K. Todos estes subtipos estão disseminados pela África. O subtipo B que também se disseminou pelas Europa, Américas e Oceania. O subtipo C é predominante nas populações asiáticas, e é responsável por 48% das infecções mundiais seguido pelos subtipos A e B que são responsáveis por 12,5% e 10,9% de todas as infecções (STEPHENS, 2012). O HIV 2 corresponde a uma parcela muito menor de infecções mas não menos importantes, as diferenças existentes entre HIV1 e HIV2 estão relacionados a uma menor capacidade de infecção do HIV2 e a certo grau de independência do receptor CD4 e uma maior semelhança com outro retrovírus o SIV que infecta os macacos do velho mundo do (*Cercopithecus atys*). Apesar da grande semelhança na organização genômica, existe uma grande diferença entre os dois vírus em particular na proteína do ENV (envelope). O HIV2 possui subtipos A até G, o subtipo A é o responsável pela maioria das infecções, com sua principal distribuição na Guiné -Bissau e Europa. No Leste da África o genótipo B é predominante. Existem casos de dupla infecção em humanos HIV1 e HIV2 permitindo a geração de recombinantes destes dois (REEVES; DOMS, 2002a).

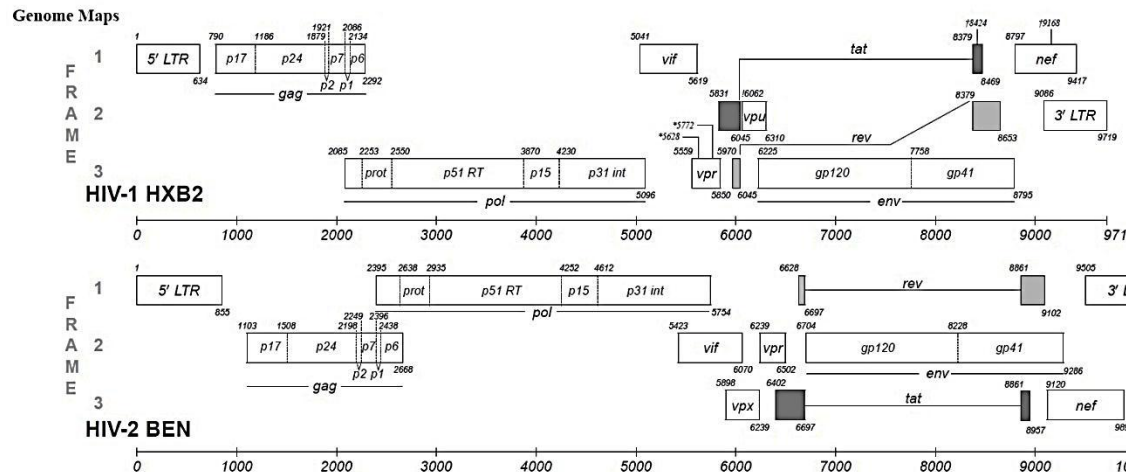


FIGURA 1.9 – GENÓTIPOS DE VÍRUS HIV, GENÓTIPOS DE HIV1 E HIV2 MOSTRANDO A SIMILARIDADE DA ESTRUTURA GENÔMICA E DO SEUS CONJUNTO DE PROTEÍNAS DOS DOIS PRINCIPAIS GENÓTIPOS (GALLO, ROBERT C, 2002B).

A partícula viral madura tem 110 até 128 nm e é composta basicamente por duas partes: (A) o core que contém as duas cópias do RNA viral, as enzimas a transcriptase reversa; a protease e a integrase; e (B) o envelope nuclear que composto pela glicoproteína gp160 responsável pela ligação e invasão do vírus a células. O genoma viral contém os genes *gag*, *pol*, *env*, *tat*, *ver*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpu* (HIV1) e *vpx* (HIV2), além de uma região *long terminal repeat* (LTR) com função estrutural e regulatória (GALLO, ROBERT C, 2002a; REEVES; DOMS, 2002b).

O gene *gag* codifica as quatro proteínas separadas que formam os blocos de montagem do core viral, a proteína do capsídeo p24; a proteína da matriz, p17, que ancora o core ao envelope viral; proteína do nucleocapsídeo, p9 e a proteína p6 que auxilia na incorporação de *vpr* nas partículas virais. O gene *pol* também codifica quatro proteínas a transcriptase reversa responsável por transcrever o genoma RNA em DNA na célula hospedeira, a protease viral responsável pelo processamento das proteínas virais após a tradução, a RNase H que ajuda a degradar o RNA viral durante e após a síntese da dupla fita de DNA e a finalmente a enzima *integrase* responsável pela inserção do genoma DNA viral transcrito no genoma da célula hospedeira. O gene *env* codifica uma única glicoproteína a gp160 para o HIV1 e a GP140 para o HIV2, esses precursores respectivamente são clivados nas proteínas de superfície gp120 e gp125 e nas glicoproteínas proteínas transmembrana gp41 e

gp36. O gene *tat* codifica para uma proteína trans ativadora de 101 KDa que regula positivamente a produção de partículas virais, ligando-se ao genoma integrado na região *transactivator active region* (TAR) estimulando a transcrição dos genes virais. O gene *rec* codifica outro gene regulatório, este regula positivamente a produção de partículas virais, mas suprime a expressão de outros genes regulatórios. O gene *nef*, fator de replicação negativa, codifica uma proteína citoplasmática de 27 KDa que retarda a replicação viral. O gene *vif*, fator de infectividade viral, codifica uma proteína de 23 KDa que aumenta a infectividade viral através da ligação e degradação da proteína celular APOBEC3G responsável por diminuir a infectividade das novas partículas virais. O gene *vpr*, proteína viral R, tem 15 KDa esta associado a produção de proteínas do vírus HIV e para o ciclo celular em G2. O gene *vpu*, proteína viral U, presente apenas em HIV1, ajuda na montagem de novas partículas virais e no brotamento destas partículas. Finalmente o gene *vpx*, presente apenas no HIV2 ajuda na replicação viral em células que não se dividem, como os macrófagos (BUSCH, MICHAEL P *et al.*, 2010b; GALLO, ROBERT C, 2002b; REEVES; DOMS, 2002a)

Os vírus HIV1 e HIV2 possuem as mesmas vias de transmissão. Esta pode ocorrer através de relação sexual sem proteção com pessoa infectada, à infecção ocorre durante o contato entre as membranas mucosas da região genital, oral ou retal; através do contato do sangue contaminado com uma ferida aberta; através do compartilhamento de agulhas entre usuários de drogas injetáveis; hemofílicos, receptores de transfusões sanguíneas e produtos do sangue; e a transmissão de mãe para filho, que pode ocorrer no útero, no parto ou através do leite materno durante a amamentação (CDC, 2011).

Existe um aspecto importante na dinâmica da infecção por HIV com impacto direto no diagnóstico (FIGURA 1.10). Pois, durante o curso da infecção existe um período onde não é possível detectar a presença das proteínas virais e nem dos anticorpos contra o HIV. Nesse período denominado como janela imunológica podem ocorrer resultados falsos negativos nos testes diagnósticos sorológicos (PETERSEN *et al.*, 1994). Os imunoensaios conseguem detectar anticorpos contra o vírus 22 dias após a infecção, a detecção do antígeno p24 é possível depois de 17 dias. Nesse período a presença do RNA viral é detectável por técnicas moleculares

como o PCR em tempo real (qPCR) que diminuem a janela imunológica para 12 dias (FIEBIG et al., 2003b).

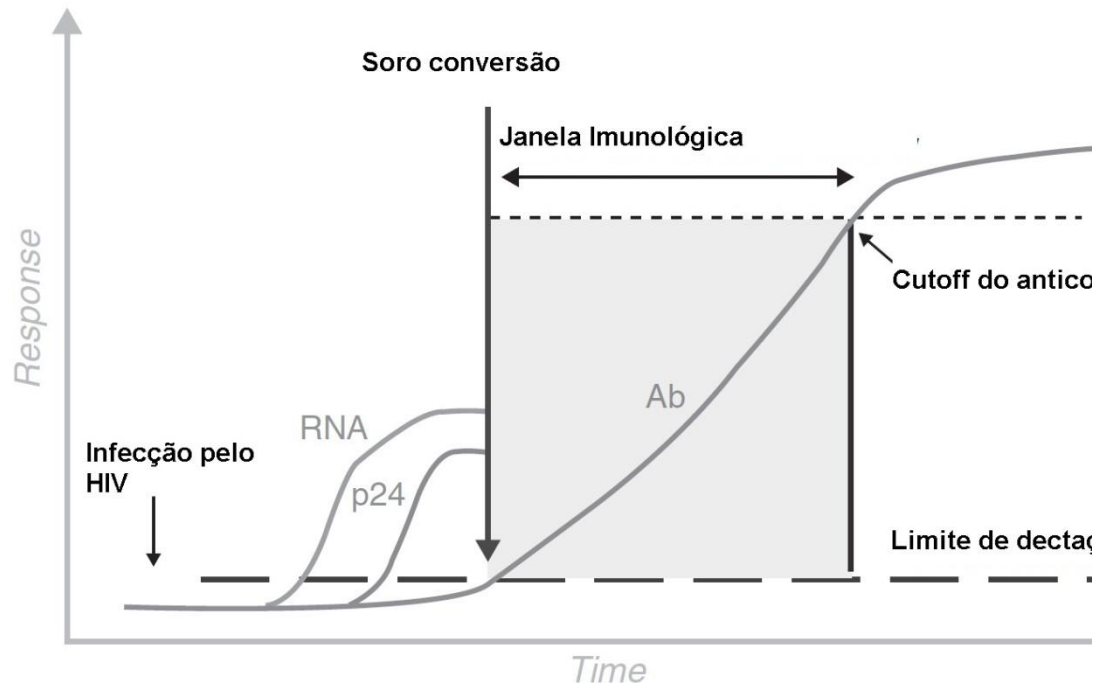


FIGURA 1.10 – RESPOSTA IMUNOLÓGICA A INFECÇÃO PELO VÍRUS, REPRESENTAÇÃO DOS DIFERENTES MOMENTOS DA INFECÇÃO PELO VÍRUS HIV TENDO EM VISTA A REPOSTA IMUNOLÓGICA E A CAPACIDADE DE DETECÇÃO DA DOENÇA PELAS METODOLOGIAS DIAGNÓSTICAS DISPONÍVEIS (BUSCH, MICHAEL P ET AL., 2010A).

Os estágios da infecção são a fase aguda, fase latente e a AIDS (Figura 1.11). A partir da infecção ocorre a fase aguda da doença, caracterizada por uma grande replicação viral, invasão dos linfonodos e consequente depleção dos linfócitos T CD4+ e CD8+ (PANTALEO et al., 1997). Neste estágio, os indivíduos podem desenvolver sintomas que duram de uma semana a um mês, semelhantes a gripe ou mononucleose, e normalmente não é possível detectar as proteínas virais nem anticorpos contra o vírus. O diagnóstico equivocado é muito comum nesta fase da doença (KAHN; WALKER, B. D., 1998). O antígeno detectável no início da infecção é a proteína p24. A infecção crônica ou latência clínica, que pode ocorrer a partir de duas semanas a vinte anos após a infecção inicial, é caracterizada por uma queda na viremia presente no sangue, a partir da presença de uma forte resposta imunológica, neste período é possível detectar as outras proteínas do sangue, como

as glicoproteínas virais de HIV1 GP120 e GP41 e a GP36 para do HIV2, além dos anticorpos contra essas proteínas em especial contra a proteína p24. A doença ou AIDS ocorre quando a contagem de linfócitos T CD4+ é menor que 200 células por μl , e caracteriza-se pela incapacidade de uma resposta imune mediada por células T, levando a ocorrência de inúmeras infecções oportunistas e câncer (“Interim proposal for a WHO Staging System for HIV infection and Disease.” 1990).

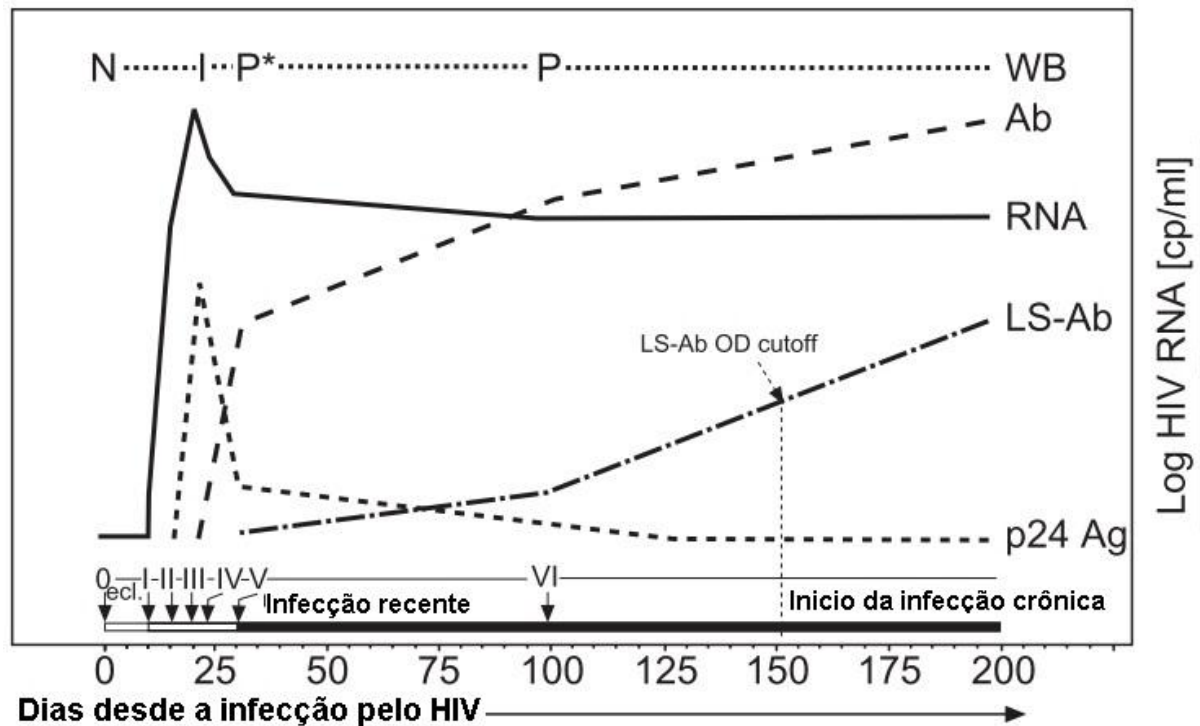


FIGURA 1.11 – DESENVOLVIMENTO DA PATOLOGIA CAUSADA PELO VÍRUS HIV, GRÁFICO MOSTRANDO O DESENVOLVIMENTO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS HIV EXIBINDO AS FASES DE INFECÇÃO PRIMÁRIA, AGUDA, LATENTE E CRÔNICA, LEVANDO EM CONSIDERAÇÃO O TEMPO E O NÚMERO DE CÓPIAS DE RNA (FIEBIG ET AL., 2003A)

Nos Hemobancos Brasileiros, por exemplo, a testagem das bolsas de sangue tem início por um ensaio imuno enzimático (ELISA). Onde as amostras com resultado negativo iniciais são considerados HIV-negativo. As amostras com resultados ELISA reagentes ou indeterminado são testadas novamente em duplicata. Se o resultado de uma duplicata de teste é reativo, a amostra é relatada como repetidamente reativa e passa por testes de confirmação com um teste complementar mais específico, por exemplo, o Western Blot (PORTARIA N 59 dia 28 de Janeiro de 2008).

A partir de 2002 recomenda-se no âmbito da Hemorrede Nacional a inclusão nos Serviços de Hemoterapia públicos, filantrópicos e/ou privados contratados pelo SUS, os testes de amplificação e detecção de ácidos nucleicos - NAT, para HIV e HCV, em todas as amostras de sangue de doadores (Portaria n.º 262, de 5 de fevereiro de 2002).

1.8 HTLV

Os vírus T-linfotróficos Humanos foram descobertos nos anos 80 a partir de seu isolamento em pacientes com neoplasia maligna de linfócitos T, mais especificamente nos EUA em 1979 foi descoberto o HTLV-1 (POIESZ *et al.*, 1980; YOSHIDA *et al.*, 1984). Esta foi a primeira evidencia formal que os retrovírus podem causar neoplasia em humanos. O HTLV-2 foi isolado em 1982 no Japão a partir de linhagem de células neoplásicas cancerosas de Leucemia (SEIKI *et al.*, 1983). Desde então são referidos como HTLV1/2. Estima-se que no mundo existam de 15 a 20 milhões de indivíduos infectados por HTLV-1 e/ou HTLV-2 (THÉ, DE; BOMFORD, 1993).

A transmissão viral entre indivíduos ocorre por relação sexual, amamentação, compartilhamento de seringas, material perfuro cortante contaminados, transfusão sanguínea e outros meios que envolvam contato com sangue infectado, mas na maioria destes casos requer a célula carregando o genoma viral, explicando a baixa infecciosidade. A transmissão dentro do organismo ocorre através do contato célula-célula. Ao contrario do HIV este existe predominantemente associado a célula na forma de provírus, os linfócitos T infectados raramente produzem partículas virais, consequentemente a carga viral no plasma é praticamente indetectável. Este tem preferencia pelos linfócitos T CD4+, mas também pelos linfócitos T CD8+ também são um importante reservatório para o vírus (Couroucé, Pilonel, & Saura, 1999; Vrieling, Zaaijer, & Reesink, 1997).

Geralmente a doença aparece vários anos após a infecção, mas progride rapidamente. Na infecção por ambos os vírus, apenas 2 a 3% dos indivíduos infectados desenvolvem ATL (leucemia/linfoma de células T no adulto) e entre 1% e

2% desenvolvem PET/MAH (mielopatia/paraparesia espástica tropical, que é um quadro neurológico degenerativo crônico) (KAUL et al., 2010b).

O HTLV pertence à família Retroviridae, e ao gênero Deltaretrovírus. Tem um formato arredondado de 100 nm de diâmetro, composto por duas camadas protetoras: a mais externa com origem na célula hospedeira contém as proteínas transmembrana e de superfície do vírus. Dentro desta está o capsídeo icosaédrico que contém o RNA simples fita positivo viral, com 9.000 bases, a transcriptase reversa, integrase e uma protease. O RNA depois da infecção é transcrito em DNA dupla fita e inserido no genoma, codificando as típicas proteínas retrovirais estruturais, funcionais, do envelope, proteínas regulatórias virais (ALBRECHT; LAIRMORE, 2002). Os genomas de HTLV1 e HTLV2 podem ser divididos em cinco regiões 5' LTR, *gag*, *pol*, *env*, *pX* e 3' LTR. As principais proteínas produzidas pelo gene *Gag* que codifica para as proteínas estruturais que formam a partícula virais, p19 componente da matriz, p24 componente do capsídeo e p15 componente do nucleocapsídeo; o gene *pol* codifica para a protease p14 que cliva o produto de *gag* para produzir as partículas virais maduras e também a transcriptase reversa p95 e a integrase. *Env* produz a glicoproteína de superfície gp46 e a proteína transmembrana gp21. *Tax* é a proteína trans ativadora da transcrição do genoma viral na célula hospedeira se ligando a região 5'LTR e finalmente *Rex* que atua como moduladora do transporte de mRNA viral (SUZUKI; GOJOBORI, 1998a; VERDONCK et al., 2007a).

O HTLV1 e o HTLV2 possuem o genoma mais estável entre os vírus RNA, acredita-se que os motivos para isso estejam ligados a um baixo número de ciclos de replicação por ano, uma transcriptase reversa com grande fidelidade e finalmente associado ao fato que o vírus só se replica no advento de meiose da célula hospedeira, além disso estes dois vírus compartilham a mesma organização genômica e seus genomas possuem entre 65-70% de similaridade (SALEMI et al., 1999).

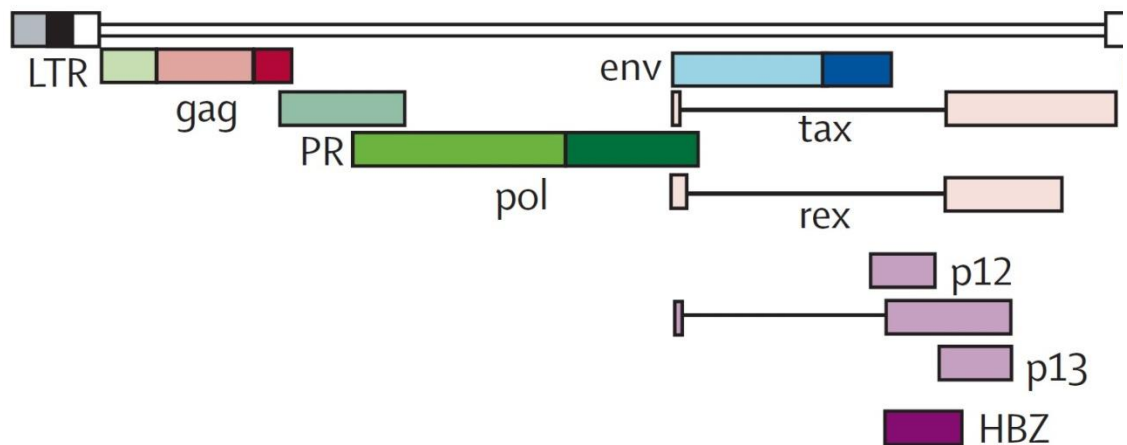


FIGURA 1.12 – REPRESENTAÇÃO DO GENOMA HTLV1 E HTLV2 COM OS SEUS GENES (VERDONCK ET AL., 2007B)

A infecção pelos vírus HTLV está presente em todo o planeta. Assume-se que o ancestral de todos os vírus linfotrópicos de células T de primatas (PTLV) se originou no continente africano, pois este é o único continente onde foram encontrados todos os PTLV conhecidos: os causadores da doença em humanos, HTLV de 1 a 4, e seus correspondentes causadores de doenças em símios (STLV) tipo 1 a 3. Há um vírus similar ao HTLV1 que infecta símios, o STLV1, estes não podem ser separados filogeneticamente em duas espécies de acordo com sua origem sugerindo uma recorrente transmissão entre espécies. HTLV1 possui os subtipos HTLV1b, HTLV1c, HTLV1e, HTLV1f e HTLV1g que são encontrados na África, o subtipo HTLV1a se tornou cosmopolita e é responsável pelas infecções no restante do mundo. O HTLV1 está distribuído na África, Ásia, Oceania, Américas e Europa, sua distribuição acompanha a migração humana ao longo dos anos (SUZUKI; GOJOBORI, 1998b).

A infecção por HTLV2 acontece principalmente com usuários de drogas injetáveis e doadores de sangue nos EUA, Europa e Ásia. É considerado endêmico em muitas tribos indígenas americanas, infecções com HTLV2 também foram registrado na tribos de pigmeus africanos, acredita-se que este tenha surgido através de frequente transmissão interespecie de primatas não humanos e o ser humano, sugerindo uma co-evolução mais antiga, o vírus mais próximo do HTLV2 é chamado STLV2 e foi isolado do primata *Pan paniscus* na África, a divergência

genética entre estes dois vírus é de 25%. O HTLV2 possui os subtipos HTLV2a, HTLV2b, HTLV2c e HTLV2d.

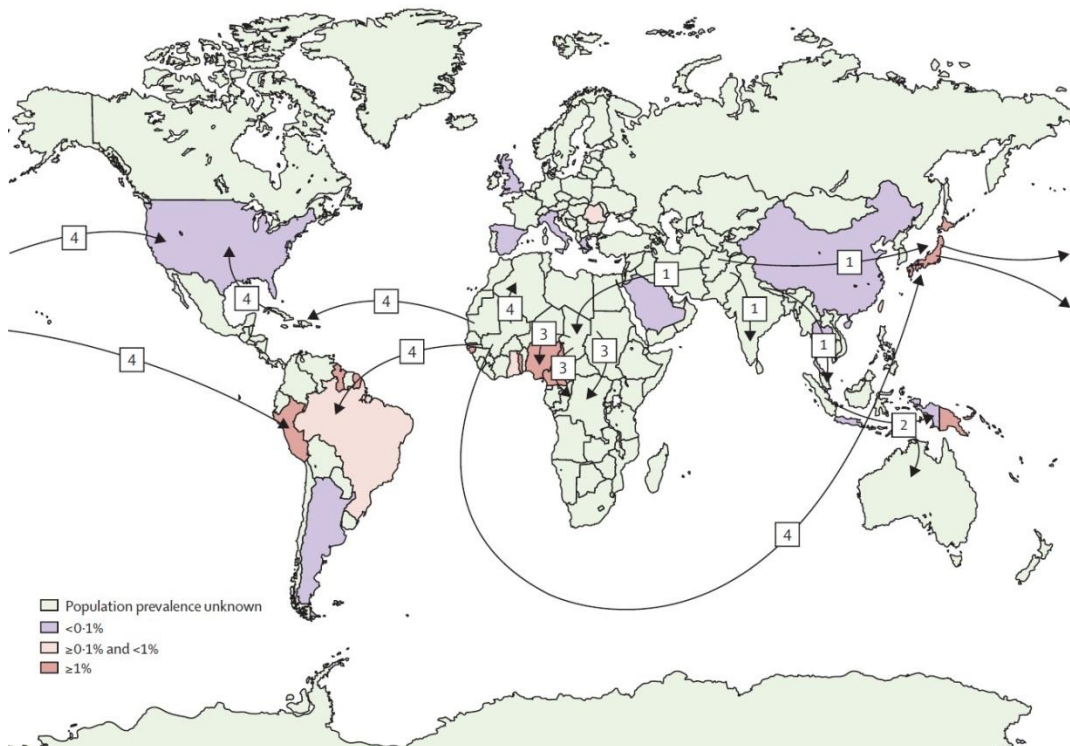


FIGURA 1.13: DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO HTLV, DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS EM RELAÇÃO AS GRANDES MIGRAÇÕES HUMANAS PELO MUNDO (SUZUKI; GOJOBORI, 1998B)

Estudos filogenéticos sugerem que o HTLV1 migrou para a América do Sul através de várias entradas, com os escravos vindos da África no século 16 e com a imigração japonesa no século 20. Todos os países da América do Sul tem a presença do HTLV1 em suas populações com uma prevalência que varia de 0.1% até mais de 5%. As frequências de prevalência mais altas estão no Brasil, Colômbia e Peru, sendo o subtipo B o prevalente nesses países. A distribuição do HTLV2 nesta região é diferente da do vírus HTLV1. Baseado em análises filogenéticas acredita-se que esta já estava presente na região desde os tempos pré-colombianos, mas que uma reintrodução com os escravos também possa ter acontecido (CARNEIRO-PROIETTI *et al.*, 2006).

O diagnóstico para HTLV-1/2 se faz, geralmente utilizando teste tipo ELISA, por exame sorológico para pesquisa de anticorpos no sangue. Porém, um dos problemas encontrados está ligado a alta taxa de falsos positivos. Em caso deste teste ser reativo (positivo) um teste confirmatório é realizado para confirmar e

diferenciar anticorpos anti-HTLV-I e anti-HTLV-II através de Western Blot. Todavia, esse teste também é difícil de ser resolvido mesmo os mais recentes que utilizam proteínas recombinantes (CARNEIRO-PROIETTI *et al.*, 2006; KAUL *et al.*, 2010b; SABINO, E C *et al.*, 1999). Como consequência o fluxograma para análise de positividade é extremamente complexo (Figura 1.14).

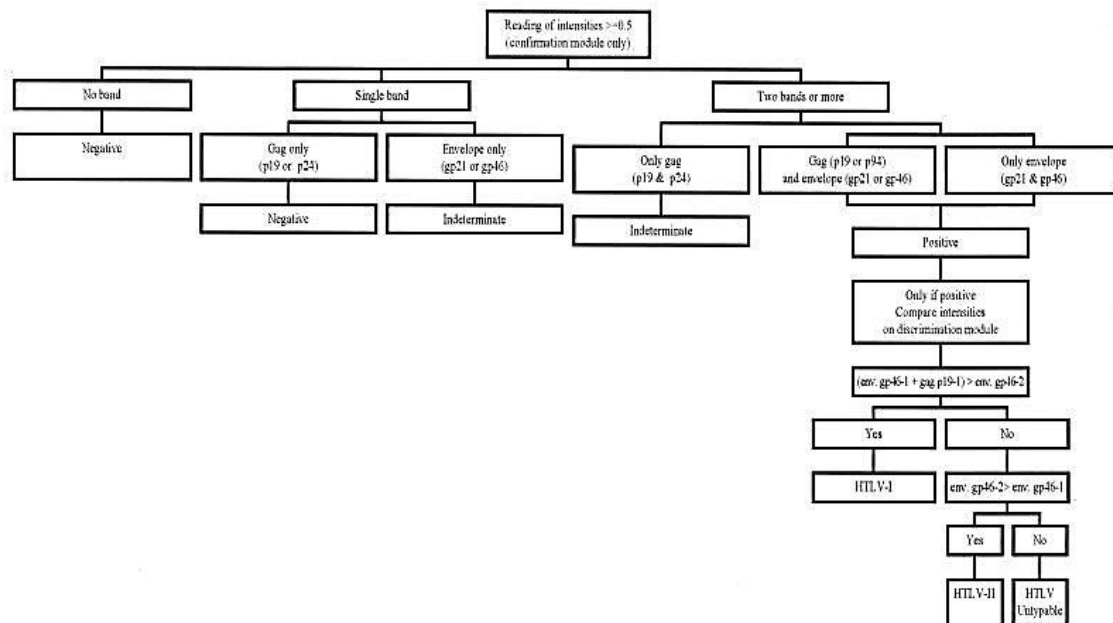


FIGURA 1.14 - FLUXOGRAMA PARA INTERPRETAR O DIAGNOSTICO DE HTLV (SABINO ET AL., 1999)

1.9 SÍFILIS

Conhecidamente uma doença sexualmente transmitida, provocada pela bactéria da família das Spirocheta, *Treponema pallidum*, teve grande impacto epidemiológico e disseminação no período das grandes navegações durante século XV ao XIX (MORENS *et al.*, 2008). Apesar de haver testes diagnósticos simples, validados, medidas efetivas de prevenção e tratamentos baratos. Esta ainda continua sendo um problema global com aproximadamente 12 milhões de novos infectados a todo ano (WHO, 2007).

O primeiro registro de surto de doença venérea com as características da sífilis ocorreu em Nápoles. Em seguida esta se espalhou pela Europa no século 15 e 16, chegando a Alemanha, Suíça, Inglaterra, e Holanda e também se alastrando

pela Índia, China e Japão. Existem duas teorias que tentam explicar a invasão da Sífilis na Europa, alguns acreditam que Colombo e sua população trouxeram a doença no Mundo Novo uma vez que foram encontradas lesões causadas por infecção por sífilis em esqueletos dos nativos americanos. A segunda teoria argumenta que nos séculos 13 e 14 esta já circulava pela Europa com nome de lepra venérea e com o advento ou aumento das navegações durante o período colonial esta se alastrou a partir da Europa tornando-se o primeiro produto europeu globalizado. Em 3 de março de 1905, Schauddin & Hoffmann definiram o postulado que uma bactéria era a causadora da Sífilis. Até a descoberta da penicilina por Fleming em 1928, mercúrio era utilizado em seu tratamento. Nos Estados Unidos durante a segunda guerra mundial a incidência de sífilis era de aproximadamente 500.000 infecções por ano. Com a utilização da penicilina esse número caiu para 32.000 infecções por ano (FENTON *et al.*, 2008a).

Apesar desta doença ter uma distribuição global, ela na realidade esta representada de forma endêmica a populações com características específicas que permitam a transmissão da doença: como características demográficas, temos as populações com baixo status sócio econômico, baixo acesso a saúde, e baixo nível educacional; e de comportamento, homens que fazem sexos com homens e usuários de drogas que trocam sexo por drogas. Nos países em desenvolvimento a maior preocupação esta ligada a transmissão vertical da doença, possibilitando o aparecimento da sífilis congênita (MS, 2006).

A sífilis congênita é a sífilis adquirida pelo feto durante a gravidez ou durante o parto, por transmissão materna que possui sífilis primária ou secundária. Estima-se que um milhão de grávidas sejam afetadas por ano. Estima-se ainda que aproximadamente 270.000 bebês nascem anualmente com sífilis congênita. Além disto, a sífilis materna esta associada a cerca de 460.000 gestações interrompidas e 270.000 nascimentos prematuros ou abaixo do peso (WALKER, D. G.; WALKER, G. J. A., 2002a). A infecção congênita em 80% dos casos tem consequências graves, quando não tratada pode provocar aborto, nascimento prematuro, malformação do feto, e no recém-nascido hepatoesplenomegalia e morte súbita. O individuo fruto dessa gravidez quando chega ao inicio da idade adulta pode desenvolver uma grande variedade de doenças neurológicas (WALKER, D. G.; WALKER, G. J. A., 2002b). Também existe a sífilis decapitada, muito rara atualmente, se refere à sífilis

adquirida através de transfusão de sangue, onde após a infecção esta já se inicia na sífilis secundária.

A infecção por sífilis é dividida em quatro estágios relacionados com sintomas específicos, duas a seis semanas após a infecção ocorre a sífilis primária caracterizada pelo aparecimento de uma pequena ferida ou ulceração firme e dura, cancro, que ocorre na região onde ocorreu contato com a bactéria, esta está repleta de células de treponema. A lesão permanece de 4 a 6 semanas, desaparecendo espontaneamente, acredita-se que isto ocorra devido a ação do sistema imune através da fagocitose pelos macrófagos ativados pelos linfócitos T, mesmo assim algumas células sobrevivem permitindo a infecção crônica, essa sobrevivência está ligada a capacidade do treponema em realizar variação antigênica das suas proteínas de membrana, escapando assim do sistema imune. Se não tratada em até seis meses ocorre a sífilis secundária caracterizada pelo aparecimento de erupções cutâneas no tronco e membros, essas lesões atingem também a palma das mãos e solas dos pés, resultado da multiplicação e disseminação do treponema pelo organismo. Durante a sífilis secundária além das lesões, vários sinais clínicos clássicos ocorrem febre baixa, dor de cabeça, linfadenopatia generalizada, entre outros. As lesões secundárias somem depois de algumas semanas, mas apesar da ausência de sintomas clínicos, exames de baço e linfonodos confirmam a presença do treponema. Nesta fase o paciente é super infeccioso. O último estágio ou a sífilis terciária ocorre de 1 a 10 anos após a infecção onde aparecem gomas sífilíticas, tumorações amolecidas vistas na pele e nas membranas mucosas, podem ocorrer deformidades articulares e das juntas, nas manifestações mais graves podem ocorrer a neurosífilis com a invasão dos treponemas no sistema nervoso central e a sífilis cardiovascular através da replicação dos treponemas na aorta pode causar aneurismas, aortite, ou endocardite aórtica (FENTON *et al.*, 2008b; KENT; ROMANELLI, 2008).

O *Treponema pallidum* tem um genoma com aproximadamente 1,3Mb com um conteúdo de GC de 52,8%, contendo 1125 genes e 54 genes não codificantes de proteínas mas que codificam os tRNA (45), rRNA (6) e ncRNA (3) (CEJKOVÁ *et al.*, 2012).

O diagnóstico da doença atualmente pode ser realizado através de testes sorológicos ou visualização por microscopia imunofluorescência direta. Mais recentemente, testes para amplificação de ácidos nucleicos, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), vêm sendo desenvolvidos e avaliados, com resultados que indicam o aumento da sensibilidade (91%) para o diagnóstico da infecção pelo *T. pallidum*. A utilização de testes sorológicos permanece como sendo a principal forma de se estabelecer o diagnóstico da sífilis. São divididos em testes não-treponêmicos, o VDRL (Venereal Diseases Research Laboratory) e o RPR (Rapid Plasma Reagin) são os testes utilizados para a triagem sorológica da sífilis, tendo em vista a sua elevada sensibilidade (RPR – 86 a 100% e VDRL – 78 a 100%) e a possibilidade de titulação, o que permite o acompanhamento sistemático do tratamento. Estes testes são de realização simples, rápida e de baixo custo, as principais desvantagens referem-se aos resultados falso-positivos e falso-negativos. Os testes treponêmicos, TPHA (Treponema pallidum Hemagglutination); FTAAbs (Fluorescent Treponemal Antibody - Absorption), e ELISA são os testes utilizados para a confirmação da infecção pelo *T. pallidum*, permitindo a exclusão dos resultados falso positivos dos testes não-treponêmicos, tendo em vista a sua elevada especificidade (TPHA – 98% a 100%; FTAAbs – 94% a 100%; ELISA – 97% a 100%). Esses testes não são utilizados na rotina de triagem sorológica, tendo em vista a sua menor sensibilidade em comparação a dos testes não-treponêmicos (TPHA – 85% a 100%; FTA-Abs – 70% a 100%; ELISA – 82% a 100% (Manual Sífilis Congênita, MS, 2006).

1.10 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de técnicas imunoenzimáticas que tiveram início com os radioimunoensaios (RIA) desenvolvidas por Yallow & Berson (1960) para medição de insulina endógena do plasma, Rosalyn viria a ser agraciado com o Prêmio Nobel 1977 de Medicina para "o desenvolvimento de RIA para hormônios peptídicos". Posteriormente, baseados na técnica de RIA Engvall e Pearlmann desenvolveram o metodologia ELISA em 1971. Estes decidiram não patentear a tecnologia desenvolvida por eles. Isto permitiu um evolução mais rápida dessa metodologia. Estas são amplamente utilizadas na área de pesquisa e de diagnóstico em saúde, essa metodologia permitiu o desenvolvimento de testes com maior especificidade, sensibilidade, simplicidade e economia quando comparada aos radioimunoensaios (ENGVALL; PERLMANN, 1971; WU, 2006; YALOW; BERSON, 1960; YAN et al., 2005).

Apesar da ampla utilização, esta metodologia tem limitações, quando por exemplo da necessidade de detecção de diferentes patógenos em uma mesma amostra a utilização destes testes é laboriosa e onerosa, o que levou ao desenvolvimento de outras metodologias (JOOS *et al.*, 2002; LEQUIN, 2005).

Uma metodologia que pode atender a esta demanda de múltiplas determinações é a metodologia denominada de microarranjos líquidos, que já está sendo utilizada em nosso laboratório. Esta tecnologia faz uso de micropartículas esféricas de poliestireno denominadas microesferas, as quais possibilitam quantificar e identificar múltiplos alvos em uma única amostra. A metodologia dos microarranjos líquidos desenvolvida com base em tecnologias já estabelecidas - citometria de fluxo, lasers, microesferas, processamento de sinal digital e química tradicional - vem conquistando popularidade nas áreas de imunodiagnóstico e pesquisa básica, com um número cada vez maior de trabalhos publicados (ELLINGTON *et al.*, 2010; VIGNALI, 2000b).

Em relação ao ELISA, os microarranjos líquidos apresentam como vantagens maior sensibilidade, fornecerem resultados em tempo mais curto, requererem um número menor de passos para a sua execução, necessitarem de um

volume muito menor da amostra a ser testada, possibilitarem a análise de diversos alvos simultaneamente e, finalmente, apresentar uma faixa mais ampla de detecção, o que elimina a necessidade de se fazer diluições das amostras. A captura de alvos por partículas em suspensão é muito mais eficiente do que em uma superfície estática, como na placa de ELISA. O formato multiteste reduz, significativamente, a quantidade de amostra necessária para a detecção por ensaio (HOUSER, 2012; MORGAN *et al.*, 2004; TÁRNOK *et al.*, 2003).

Os microarranjos líquidos permitem a aplicação de protocolos rápidos e de baixo custo, possuindo grande flexibilidade, pois na mesma plataforma podem ser realizados diversos formatos de bioensaios, incluindo ensaios de ácidos nucleicos, receptor-ligante, imunoensaios e ensaios enzimáticos. Com a escolha dessa metodologia, estamos empregando os conhecimentos tecnológicos mais avançados disponíveis, com possibilidade de aplicação e uso do produto no contexto da Saúde Pública Brasileira. A grande capacidade de processamento e flexibilidade desse sistema tornam factíveis também, sua adequação para a análise de outros alvos que futuramente poderão ser inseridos dentro da mesma plataforma tecnológica como, por exemplo, as doenças ditas negligenciadas. Essa iniciativa propiciará, ainda, a aquisição de competência no país em uma tecnologia cuja tendência é dominar o setor de diagnóstico em um futuro próximo.

A metodologia dos microarranjos consiste no emprego de uma mistura de diferentes tipos de microesferas, uniformes em tamanho como suporte sólido, mas que emitem intensidades de fluorescência distintas, para diferentes moléculas de captura, sejam elas anticorpos, antígenos, peptídeos ou ácidos nucleicos.

A ligação das moléculas de captura, já acopladas a cada uma das microesferas com seus alvos é detectada através da utilização de um conjugado (molécula repórter) também fluorescente (FULTON, R. J. *et al.*, 1997; VIGNALI, 2000a). Apesar do desenvolvimento dos primeiros citômetros de fluxo comerciais ter ocorrido há mais de vinte e cinco anos, essa técnica vem sendo mais difundida recentemente a partir do lançamento no mercado do equipamento Luminex®, pela empresa LuminexCorp, exclusivamente dedicado a esse fim. Esse equipamento consiste em um citômetro de fluxo compacto, composto por um processador de sinal digital e dois canais de laser capazes de excitar os fluorocromos das microesferas

(atualmente existem cem microesferas com endereços espectrais distintos) e do repórter (KELLAR; IANNONE, 2002).

Por permitir a detecção de ácidos nucleicos e proteínas, a metodologia de microarranjo líquido serve como substituta tanto para a técnica de microarranjo de DNA como para os testes imunoenzimáticos, com a vantagem, sobre este último, de possibilitar análise de diversos parâmetros simultaneamente. Além de permitir a análise de vários alvos ao mesmo tempo, a técnica de microarranjo líquido apresenta como benefícios: custo reduzido, maior facilidade na interpretação dos resultados, maiores velocidade de execução, maior sensibilidade associada à melhoria na cinética de hibridação, e maior flexibilidade (DUNBAR, 2006), sendo ideal para a avaliação simultânea de dezenas de alvos em muitas amostras e em um curto período de tempo.

2 OBJETIVOS E METAS

2.1 OBJETIVO:

Neste projeto visamos à obtenção de uma metodologia de diagnóstico baseado na plataforma de microarranjos líquidos capaz de detectar a presença de anticorpos e/ou antígenos circulantes para a hepatite B, hepatite C, HIV, doença de Chagas, sífilis e HTLV.

2.2 METAS:

Obtenção e avaliação dos antígenos e anticorpos que servirão de base para o desenvolvimento da metodologia proposta;

Montagem de um painel sorológico de referência contendo amostras sabidamente reagentes e não reagentes para a doenças objeto deste estudo..

Otimização dos ensaios de detecção utilizando diferentes concentrações de antígenos e/ou anticorpos,

Desenvolvimento dos controles positivos e negativos

Avaliação da metodologia de microarranjo líquido utilizando soros referência com o objetivo de definir sua sensibilidade e especificidade;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMOS E LINHAGEM CELULAR

Escherichia coli, cepa TOP 10F' {lac Iq, Tn 10 (TetR) mer A Δ (*mrr-hsd RMS-merBC*) Δ 80 *lacZ*

3.2 PLASMÍDEO E VETOR DERIVADO DE BACTERIÓFAGOS

pAcGFP-C3 (Clontech, Mountainview-CA, EUA)

3.3 MEIOS DE CULTURA

Meio LB (Luria-Bertani): Bacto-triptona 10 g/l; extrato de levedura 5 g/l; NaCl 5 g/l

Meio LB/amp: LB contendo ampicilina 100 µg/ml

Meio LB /amp/cana (LB contendo ampicilina 100 µg/ml; canamicina 10 µg/ml)

3.4 SOLUÇÕES.

Tampão de Ativação, 0,1M NaH₂PO₄, pH 6.2

Tampões de Ligação:

MES, ácido 2-N-morfolinoetanosulfônico, 100mM pH5.5;

MES, ácido 2-N-morfolinoetanosulfônico, 100mM pH6.5;

PBS Tampão fosfato 20 mM, pH 8.0; NaCl 150 mM

Tampão Bicarbonato de Sódio, NaHCO₃ pH 8.0.

Tampão de Ensaio PBS, 1% BSA, 0.02% Tween 20, 0.01% azida de sódio;

Extrato de E.coli. Extrato bacteriano 10mg/ml em Tampão de Ensaio;

Anticorpo Secundário anti-Ig humano ligado a Ficoeretrina (Moss Substrates, Pasadena – CA, EUA)

EDC 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida, (Pierce, Rockford-IL, EUA);

SulfoNHS sulfo-N-hidroxissuccinimida, (Pierce, Rockford-IL, EUA);

3.5 IDENTIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS E ANTICORPOS PARA A UTILIZAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DO TESTE DIAGNÓSTICO.

Para o início do trabalho foi realizada uma busca para identificar os antígenos e anticorpos candidatos para o multiteste criando uma lista dos que já eram utilizados em pesquisa e em testes diagnósticos do tipo Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) para a detecção de HIV 1 e 2, HTLV I e II, HCV, HBV, e Trypanosoma cruzi, assim como, das empresas fornecedoras destes insumos. Esta busca foi realizada através de pesquisa na internet utilizando palavras chave abaixo na ferramenta Google scholar (Google Inc.) cuja função é a busca de publicações acadêmicas em várias bases de dados através de palavras chave. O número de publicações referentes à pesquisa com as palavras chave em inglês [Doença] e/ou [Antígeno] e/ou [ELISA] e [Empresa] foi utilizado como parâmetro para escolher os antígenos e as empresas. Em um segundo momento, quando estes antígenos e anticorpos adquiridos não atingiram os resultados esperados, foi efetuada uma busca adicional por novas empresas de fornecimento em congressos e na internet.

3.6 OBTENÇÕES DE PAINÉIS SOROLÓGICOS CARACTERIZADOS

Painéis caracterizados com testes e/ou metodologias padrão ouro, ELISA e/ou IFI foram selecionados visando sua utilização como referência para o teste em desenvolvimento, permitindo avaliar a sensibilidade e especificidade deste.

A montagem destes painéis para avaliação dos antígenos e anticorpos individuais e em formato multiteste foi realizada através de convênios de fornecimento de amostras com Institutos Referência e também através de aquisição de painéis comerciais.

O Instituto de Tecnologia em Imunológicos (BIOMANGUINHOS) pertencente a FIOCRUZ forneceu soros pertencentes ao painel de Análise Externa de Qualidade

(AEQ), utilizado pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) na validação e controle de qualidade dos kits de diagnósticos utilizados atualmente na Hemorede brasileira. O Painel AEQ tem como característica soros com alta reatividade aos marcadores das doenças. O Painel AEQ fornecido é composto por amostras tanto positivas quanto negativas para HIV, HCV, HBV, HTLV, sífilis, doença de Chagas (

Tabela 3.1).

O Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR) também forneceu amostras caracterizadas como negativas para todas as doenças avaliadas por metodologias diagnósticas padrão ouro (

Tabela 3.1).

Adicionalmente foram adquiridos também painéis comerciais referência das empresas SeraCare Life Sciences, Inc (Milford-MA, USA) e da BBI (Boston Biomedical, Inc. Norwood-MA, USA) as amostras componentes desses painéis apresentam diferentes características de reatividade essas amostras são separados por doença em diferentes painéis de soro-conversão, controle de qualidade, performance e sensibilidade (

Tabela 3.1).

A determinação dos valores de sensibilidade e especificidade dos melhores antígenos foi realizada utilizando o painel AEQ totalizando 192 amostras.

Para a avaliação do multiteste foram testados os painéis AEQ, os painéis comerciais referência e mais 50 amostras com sorologia negativa confirmada e fornecida pela HEMEPAR totalizando 638 amostras.

TABELA 3.1 - PAINÉIS SOROLOGICOS CARACTERIZADOS UTILIZADOS NO PROJETO

PAINEL		CÓDI GO	FONTE	DOENÇA	AMOST RAS
PAINEL AEQ	ANÁLISE EXTERNA DE QUALIDADE	AEQ	INCQS	CHAGAS	30
				HIV1	28
				HBV	30
				HCV	23
				SÍFILIS	28

PAINEL COMERCIAL				HTLV1	28
				NEGATIVAS	20
	HIV1 SOROCONVERSION PANEL Y	PRB925	BBI	HIV1	2
				NEGATIVAS	4
	HIV1 SOROCONVERSION PANEL D	PRB904	BBI	HIV1	2
				NEGATIVAS	3
	ANTI-HIV 1/2 QUALIFICATION PANEL	QRZ761	BBI	HIV1	4
				HIV2	1
				NEGATIVAS	1
	ANTI-HIV 1/2 QUALIFICATION PANEL	QRZ711	BBI	HIV1	4
				HIV2	1
				NEGATIVAS	1
	ANTI-HIV 1/2 COMBO PERFORMANCE PANEL	PRZ207	SERACARE	HIV1	7
				HIV2	7
				NEGATIVAS	1
	ANTI- HTLV 1/2 MIXED TITER	PRP207	SERACARE	HTLV1	7
				HTLV2	7
				NEGATIVAS	1
	ANTI- HTLV 1/2 QUALIFICATION PANEL	QRP712	SERACARE	HTLV1	3
				HTLV2	2
				NEGATIVAS	1
	ANTI TRYPAOSSOMA CRUZI PERFORMANCE PANEL	PMT202	SERACARE	POSITIVAS	14
				NEGATIVAS	1
	HEPATITIS B SOROCONVERSION PANEL SUBTYPE AD	PHM933	BBI	POSITIVAS	6
	HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN SENSITIVE PANEL	PHA808	SERACARE	POSITIVAS AD	10
				POSITIVAS AY	10
				NEGATIVAS	1
	HBSAG QUALIFICATION PANEL	QHA711	BBI	POSITIVAS AD	3
				POSITIVAS AY	2
				NEGATIVAS	1
	ANTI-HBC QUALIFICATION PANEL	QHC711	SERACARE	POSITIVAS	5
				NEGATIVAS	1
	HEPATITIS B SOROCONVERSION PANEL	PHM921	BBI	POSITIVAS	6
	HEPATITIS B SOROCONVERSION PANEL	PHM934	BBI	POSITIVAS	6
	HEPATITIS C SOROCONVERSION	PHV9	BBI	POSITIVAS	9

PANEL	01	S	
		NEGATIVA	2
		S	
HEPATITIS C SEROCONVERSION PANEL	PHV9 14	BBI	POSITIVA 5
		S	
		NEGATIVA	4
		S	
ANTI-HCV QUALIFICATION PANEL	QHV7 12	SERAC ARE	POSITIVA 5
		S	
		NEGATIVA	1
		S	
PAINEL NEGATIVAS	HEMEPAR	PH	HEMEPAR
		AR	NEGATIVA 50
		S	

3.7 AVALIAÇÃO DO IMPACTO DAS PROTEÍNAS DE *E.COLI* CONTIDAS NOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES NA PERFORMANCE DO ENSAIO

A fim de determinar se as proteínas de *E.coli* copurificadas juntamente com os antígenos recombinantes adquiridos afetavam a performance do imunoensaio foram realizadas ensaios competitivos como descrito abaixo.

3.8 PRODUÇÃO DO LISADO DE *E.COLI*

Para a preparação do lisado foi utilizada a cepa de *E. coli* DH5 α que foi cultivada em meio LB a 37 °C sob agitação a 200 rpm. O cultivo foi acompanhado através de medições em espectrofotômetro a 600 nm até a cultura atingir uma O.D. 0,8. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 10.000 x g a 4 °C durante 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento bacteriano suspenso em 200 ml de Tampão PBS 1x. A suspensão foi centrifugada novamente a 10.000 x g a 4 °C durante 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento bacteriano suspenso em 10 ml de Tampão PBS. A suspensão de células bacterianas foi lisada utilizando 4 ciclos de 20 segundos de ultrassom em potência 9 seguidos de intervalo 2 de minutos a 4 °C. O lisado obtido foi centrifugado a 20.000 x g, após a centrifugação o sobrenadante onde se encontram as proteínas solúveis foi coletado e o sedimento que contém membrana, parede celular e ácidos nucleicos foi descartado. O sobrenadante então foi filtrado com filtro 0.22 μ m (TPP, Suíça)

afim de remover células não lisadas e agregados protéicos. A concentração final de proteína contidas no sobrenadante foi estimada através de leitura no equipamento NanoDrop ® ND1000 espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific, Waltham-MA, EUA) e ajustada para uma concentração de final de 10 mg/ml.

3.9 LIGAÇÃO DO LISADO DE E.COLI AS MICROESFERAS

Sabe-se que as proteínas podem se ligar a materiais com cargas positivas como o poliestireno que é o principal componente das microesferas. Utilizamos as microesferas ativadas, ou não, sem proteína ligada para verificar se possíveis sítios que permaneciam ativados ou cargas presentes nas microesferas poderiam contribuir para sinais inespecíficos durante a realização dos ensaios. As microesferas não ativadas foram utilizadas diretamente do estoque de microesferas. As microesferas ativadas passaram pelo processo de ativação, porém, a elas não foi adicionado nenhuma proteína. Os ensaios foram realizados com o painel AEQ e os resultados analisados com o programa do Sigma Plot.

O lisado de E.coli a 10mg/ml foi ligado covalentemente as microesferas (Luminex Corp, Austin, TX) numa concentração final de 0,1mg/ml em tampão PBS. Essa ligação foi realizada conforme descrito no (item 3.15).

Os imunoensaios foram realizados conforme descrito no (item 3.11), utilizando as amostras correspondentes ao Painel AEQ descritas na (

Tabela 3.1)

3.10 DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE ANTICORPOS ANTI-BACTERIA NO SOROS HUMANOS

Para determinar a presença de anticorpos contra proteínas bacterianas nos soros humanos foram utilizadas as microesferas ligadas ao extrato de E.coli

produzidas como no (item 3.8). O ensaio foi realizado contendo as amostras de soros do painel AEQ (

Tabela 3.1). Os soros foram diluídos em tampão de ensaio com e sem a adição de Extrato de E.coli 0,1mg/ml. Os resultados foram analisados utilizando o software SigmaPlot função Curva ROC com o teste Weich.

3.11 IMUNOENSAIOS

As amostras de soro foram diluídas em tampão de ensaio em uma diluição 1:50 e o teste foi realizado seguindo os procedimentos padrão descrito pelo fabricante (Luminex Corp, Austin-TX, USA.). Para os ensaios em um formato individual, um total de 50 µl contendo 2.500 microesferas acopladas foi adicionado a cada poço de uma microplaca com 96 poços de fundo chato. O soro diluído 1:100 (50 µl) e as microesferas foram incubados sob agitação a 300 rpm por 15 minutos abrigados da luz. Com o auxílio da lavadora de placas Hydroflex (TECAN, Durham-NC) foi realizada uma lavagem com duas vezes 100 µl de tampão de ensaio, e adicionou-se 100 µl a cada poço do conjugado de anticorpo anti-IgG humana conjugado a ficoeritrina (MOSS SUBSTRATES, Pasadena-CA, EUA) diluído 1:1000, seguindo uma nova incubação e, então, nova lavagem. As incubações foram realizadas a 37 °C em agitador para placas a 300 rpm para cada incubação e as lavagens foram realizadas em lavadora de placas com suporte magnético Hydroflex (Tecan, NC, EUA). A leitura foi feita em plataforma Luminex 200 (Luminex Corp, Austin- TX, EUA).

Para os ensaios em formato multiteste, foi utilizado um código de microesfera acoplada para cada antígeno diferente. Estas foram misturadas em um volume final de soro de 50 µl contendo 2500 microesferas de cada código.

3.12 OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO

O imunoensaio padrão sugerido pelo fabricante tem tempo médio total de 2h30min para uma microplaca com 96 poços, impossibilitando a realização de mais de 3 microplacas por dia. Este tempo impede a realização de grandes números de placas, e conseqüentemente de amostras por dia. Centros que fazem a triagem sorológica testam em média de 300 a 2000 amostras por dia, ou aproximadamente 3 a 21 microplacas por dia.

3.13 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO ENSAIO

Com o objetivo de melhorar o tempo total do ensaio padrão sugerido pela empresa Luminex, e conseqüentemente aumentar o número de ensaios por dia, foram testadas diferentes variações dos parâmetros do ensaio na primeira incubação, a 37 °C tempo de 10' e 20'; e 42 °C com tempos de 10', 20' e 30'. A segunda incubação foi testada com 37 °C em 10', 15' e 20' e a 42 °C em 10', 20' e 30'. Também foram testadas as lavagens com volumes diferentes. Na primeira lavagem que corresponde a lavagem antes da adição do secundário, o poço da microplaca foi lavado 1x com 100 µl, e testado também com 1x 200 µl. A segunda lavagem que se realiza para a remoção do anticorpo secundário foi feita com 1x 100 µl, e também com 1x 200 µl, e bem como foi testada a condição sem a lavagem final. Foram utilizados os antígenos HCV Multiantígeno, HTLV 1 p24, HTLV 2 p21, HTLV ENV, Chagas LISADO, Chagas CRAFRA, HIVBIO, sífilis P17, sífilis p47, sífilis TMPA e HIV P24 nas condições previamente determinadas. Foram utilizadas 30 amostras negativas pertencentes ao painel AEQ, três pools para cada doença, cada pool composto de 10 amostras positivas do painel AEQ.

O ensaio foi realizado em formato multiteste como descrito no (item 3.11). Os resultados foram analisados utilizando o software GraphPad, onde as MIF obtidas foram avaliadas pela análise da curva ROC, os valores de cutoff estabelecidos pela análise, neste também foi gerado uma tabela e gráfico dos resultados.

3.14 AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO DO TEMPO DE ENSAIO EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE MICROESFERAS

Ainda com o objetivo de otimização do teste foram realizada avaliação do tempo necessário para que o equipamento avaliasse ao menos 100 microesferas por poço da microplata. Este número é sugerido pelo fabricante que considera 35 a 100 microsferas avaliadas por poço como estatisticamente sigficativos para determinar um resultado. Este recomenda que cada poço contenha um total de 2000 a 5000 por código de microesferas por poço. Para tanto diferentes quantidades de microesferas foram adicionados a cada poço 5000, 4000, 3000, 2000 utilizando dois diferentes tampões para a diluição das mesma, Tampão de Ensaio e SheathFluid, tampão fornecido pela empresa e necessário para o funcionamento do equipamento. Todos os pontos foram realizados em triplicata. Cada quantidade de microesferas foi testado para os tempos de análise: 40",30",20" e 10".

As contagens obtidas foram tabuladas no Microsoft Excel onde foram realizadas as médias das contagens obtidas.

3.15 ACOPLAMENTO DOS ANTÍGENOS ÀS MICROESFERAS

Os antígenos foram acoplados às microesferas de poliestireno a partir de uma ligação estável entre os grupamentos amina da proteína e os grupamentos carboxila das microesferas formando uma ligação peptídica (Figura 3.1).

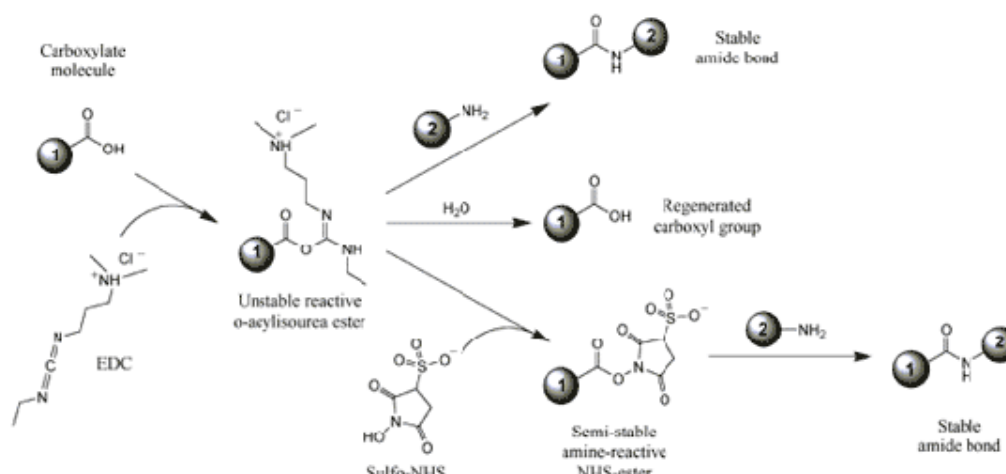


FIGURA 3.1 - ESQUEMA DA REAÇÃO DE ACOPLAMENTO

Os antígenos foram acoplados em diferentes concentrações de proteínas entre 5 a 250 µg/ml, e diferentes tampões de acoplamento. Cada antígeno foi testado individualmente nos tampões de acoplamento MES, PBS e CARBO.

As proteínas foram diluídas nos tampões de acoplamento escolhidos e mantidos a 4 °C. Desta forma, 80 µl da mistura de microesferas (equivalente a um milhão de microesferas) foram transferidas para um poço de uma microplaca. Estas foram ativadas através de duas lavagens com 100 µl do tampão de ativação com o auxílio de uma lavadora de placas Hydroflex (TECAN, Durham-NC, EUA), seguida da adição de 80 µl do tampão de ativação as microesferas, de 10 µl da solução de EDC 50 µg/ml, um agente condensador usado para mediar a formação da ligação amida entre o grupo carboxila -COOH presente na microesfera e o grupo amino -NH3 pertencente à proteína; e adição 10 µl de Solução de Sulfo-NHS 50 µg/ml, que pode elevar a eficiência da reação de acoplamento por tornar mais estável um dos intermediários da reação (Figura 3.1). Essa suspensão foi incubada sob agitação por 20 minutos a 25 °C e agitação de 300 rpm.

Em seguida as microesferas foram lavadas três vezes com 100 µl de água ultrapura. Após a lavagem, as proteínas previamente diluídas foram adicionadas à solução contendo as microesferas ativadas. A suspensão foi incubada por 2 horas a 37 °C com agitação de 300 rpm. Passado esse tempo, a suspensão foi lavada com tampão de bloqueio para remover moléculas que eventualmente não se ligaram e bloquear os sítios de ligação ainda ativados. As microesferas foram transferidas das

microplacas para tubos de polipropileno low-binding de 1,5 ml (USA Scientific, Orlando-FL, EUA) e armazenadas a 4 °C.

3.16 CONTAGEM DAS MICROESFERAS ACOPLADAS

A determinação do número de microesferas/μl para a realização do ensaio foi obtido com o contador e analisador de partículas Z2 Coulter Counter (BeckmanCoulter Inc., Brea-CA,EUA). O equipamento é capaz de ler até 10.000 partículas/segundo com tamanho contido no intervalo de 0,4 μm até 1600 μm de diâmetro.

Para realizar a contagem neste equipamento a suspensão contendo as microesferas acopladas as proteínas foi homogeneizada através de três ciclos de agitação no vortex Genius 2 (Scientific industries, Inc. Bohemia, NY, EUA) por 30 segundos seguido de banho de ultrassom (Cole-Parmer, Vernon Hills-IL, EUA) por 30 segundos. Foram transferidos 10 μl dessa suspensão para um tubo de polipropileno de 15 ml contendo 4 ml de PBS.

O equipamento Z2 Coulter Counter (BeckmanCoulter Inc., Brea-CA,EUA) foi configurado na tela set-up para ler o eventos contidos entre o limite inferior 5,5 μm e o limite superior 7,5 μm. O tamanho das microesferas utilizadas é 6,5 μm. Na tela output foi informado o valor de diluição da suspensão como 1:401. Após a contagem, o resultado obtido na tela corresponde ao valor das microsferas/ml aplicado na avaliação.

3.17 ANÁLISE DOS RESULTADOS

A detecção da ligação das proteínas acopladas as micro-esferas pelos soros é expressa pela mediana de intensidade de fluorescência (MIF) obtida a partir da medida de fluorescência da ficoeretrina ligada ao anticorpo anti-IGHumano que reconhece o imunocomplexo ligado a microesfera. As MIF obtidas foram analisadas

através da análise estatística da curva Receiver Operator Characteristic (ROC) (FAWCETT T, 2006). Nesta análise a sensibilidade é dada pela probabilidade de um teste fornecer um resultado positivo caso o indivíduo seja realmente portador da enfermidade. A especificidade corresponde a probabilidade do teste fornecer um resultado negativo em relação aos indivíduos não portadores da doença. Os positivos verdadeiros correspondem ao número de indivíduos sabidamente enfermos e detectados como positivos pelo teste. Falsos positivos correspondem aos indivíduos não doentes detectados como positivos. O valor dos negativos verdadeiros é dado pelos indivíduos não enfermos detectados como tal pelo teste. Já o valor dos falsos negativos é dado pelas amostras sabidamente positivas detectadas como negativa para o teste (Figura 3.2). Com essa análise foi possível determinar os valores de sensibilidade e especificidade dos antígenos ligados as micro-esferas, e consequentemente determinar o melhor valor limite de corte ou cutoff , definido como o valor limite acima ou abaixo do qual o resultado de um exame pode ser considerado positivo .

		Doença		Total
		Presente	Ausente	
este teste	Positivo	Verdadeiro Positivo (VP)	Falso Positivo (FP)	VP+FP
	Negativo	Falso Negativo (FN)	Negativo Verdadeiro (VN)	FN+VN
Total		VP+FN	FP+VN	VP+FP+FN+VN

FIGURA 3.2 MATRIZ GERADA A PARTIR DE UM CONJUNTO DE INSTÂNCIAS.

A partir desses valores de resultados verdadeiros positivos e verdadeiros negativos, falsos positivos e falsos negativos, é possível calcular parâmetros como o valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, precisão, acurácia, sensibilidade e, especificidade; Sensibilidade (S): é a probabilidade de um teste dar positivo na presença da doença. Especificidade (E): é a probabilidade de um teste dar negativo na ausência da doença. Valor preditivo positivo (VPP): é a proporção de verdadeiros positivos entre todos os indivíduos com teste positivo e expressa a probabilidade de um paciente com o teste positivo ter a doença. Valor preditivo negativo (VPN): é a proporção de verdadeiros negativos entre todos os indivíduos com teste negativo e expressa a probabilidade de um paciente com o teste negativo não ter a doença. Precisão: é o grau de variação de resultados de uma medição. Acurácia: que se refere à conformidade com o valor real. Abaixo as fórmulas dos parâmetros relevantes para as análises: Sensibilidade (S) = $\frac{VP}{VP + FN}$

$$VP + FN$$

$$\text{Especificidade (E)} = \frac{VN}{VN + FP}$$

$$\text{Valor Preditivo Positivo (VPP)} = \frac{VP}{VP + FP}$$

$$\text{Valor Preditivo Negativo (VPN)} = \frac{VN}{VN + FP}$$

$$\text{Precisão} = \frac{VP + FN}{VP + FP + FN + VN}$$

$$\text{Acurácia} = \frac{VP + VN}{VP + FP + FN + VN}$$

3.18 SELEÇÃO DOS ANTÍGENOS

Através da análise curva Roc dos resultados das MFI dos antígenos submetidos a diferentes condições de acoplamento e testados com o Painel AEQ foi possível definir quais os valores de sensibilidade e especificidade de cada antígeno para cada possível cutoff. As condições de acoplamento onde os antígenos apresentaram a maior sensibilidade foram selecionadas para compor o multitest.

Os gráfico da curva ROC e os scatter plot da análise ROC foram gerados utilizando o pacote de software estatístico GraphPad Prism 5 e os gráfico de Sensibilidade X Especificidade X Cutoff foram gerados utilizando o SigmaPlot para Windows Versão 12

3.19 DEFINIÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ACOPLAMENTO

Os melhores antígenos e condições para cada doença foram comparadas entre si. Desta forma, foram comparadas as áreas das curvas ROC obtidas avaliando os parâmetros sensibilidade e especificidade, VPN, VPP, precisão e acurácia.

4 RESULTADOS

4.1 ANTÍGENOS PROSPECTADOS

Na Tabela 4.1 o número de artigos resultantes da busca utilizando as palavras chave. A empresa Fitzgerald Industries International (Acton, MA, EUA) apresenta o maior número de publicações para várias doenças, seguida pela Microbix Biosystems Inc (Mississauga, Ontario, Canada), Austral Biologicals (San Ramon, CA, EUA), Virogen (Watertown, MA, EUA) e Prospec. (Rehovot, Israel).

TABELA 4.1 - NÚMERO DE ARTIGOS REFERENTE ÀS BUSCAS POR PALAVRAS CHAVE.

EMPRESAS	FITZGERALD	MICROBIX	AUSTRAL BIOLOGICALS	VIROGEN	PROSPEC
PALAVRAS-CHAVE	1730	1150	706	198	17
HIV	242	172	99	59	2
HIV+ELISA	121	65	47	25	2
HIV+ELISA+P24	28	6	16	6	2
HIV+ELISA+P31	0	0	0	0	0
HIV+ELISA+GP41	11	3	5	2	1
HIV+ELISA+GP120	22	8	13	7	1
HIV+ELISA+GP160	5	3	2	2	1
HBV	29	21	17	9	0
HBV+ELISA	17	7	8	4	0
HBV+ELISA+HBSAG	4	1	4	0	0
HBV+ELISA+HBEAG	4	1	3	0	0
HBV+ELISA+HBCAG	3	1	2	0	0
HBV+ELISA+ANTI-HBS	0	0	0	0	0
HBV+ELISA+ANTI-HBE	0	0	2	0	0
HBV+ELISA+ANTI-HBC	0	0	0	0	0
HCV	42	29	46	34	1
HCV+ELISA	27	11	23	12	1
HCV+ELISA+ANTI HCV	6	0	45	33	1
HCV+ELISA+NS3	6	0	21	22	0
HCV+ELISA+NS4	7	0	9	15	0
HCV+ELISA+CORE	23	11	28	29	0
HTLV	21	22	13	8	1

HTLV+ELISA	13	7	9	5	1
SÍFILIS	13	7	4	0	0
SÍFILIS+ELISA	6	6	0	0	0
CHAGAS	16	4	1	1	0
CHAGAS+ELISA	7	1	1	0	0

O resultado da análise de busca das empresas fornecedoras de antígenos nos permitiu determinar os antígenos mais utilizados para diagnóstico, seus fornecedores e número de citações. A partir dessa informação foi realizada a aquisição dos antígenos para o desenvolvimento do multiteste. A Tabela 4.2 mostra os antígenos que foram adquiridos e seus respectivos fornecedores. Nesta etapa ainda houve uma consulta a estas empresas em relação ao envio de material para o Brasil com garantia de sua chegada em condições ideais. Abaixo a lista de Antígenos e as respectivas empresas fornecedoras.

TABELA 4.2- ANTÍGENOS AVALIADOS

DOENÇA	ANTÍGENO	EMPRESA
CHAGAS	LISADO	BIOMANGUINHOS
CHAGAS	CRAFRA	BIOMANGUINHOS
CHAGAS	RECOMBINANT CHIMERIC CHAGAS MULTIANTIGEN	PROSPEC
CHAGAS	RECOMBINANT CHIMERIC CHAGAS MULTIANTIGEN	FAPON
HBV	CORE	FITZGERALD
HBV	CORE	MEDIDIAN
HBV	HBSAG ADW SUBTYPE	FITZGERALD
HBV	RECOMBINANT HEPATITIS B VIRUS CORE (1- 186)	PROSPEC
HBV	CORE	VIROGEN
HCV	NS3	FITZGERALD
HCV	NS3 HELICASE	FITZGERALD
HCV	NS4 MOSAIC	FITZGERALD
HCV	NS5	FITZGERALD
HCV	CORE	MERIDIAN
HCV	RECOMBINANT HEPATITIS C VIRUS COMBINED	PROSPEC
HCV	RECOMBINANT HEPATITIS C VIRUS NUCLEOCAPSID (CORE) 22KDA	PROSPEC
HCV	RECOMBINANT HEPATITIS C VIRUS NS3 (1450- 1643)	PROSPEC
HCV	RECOMBINANT HEPATITIS C VIRUS NS4 MOSAIC	PROSPEC
HCV	RECOMBINANT HEPATITIS C VIRUS NS5	PROSPEC
HCV	HCV CHIMERIC RECOMBINANT ANTIGEN	FAPON
HIV-I	ENV TIPO O	VIROGEN
HIV-I	GP120	FITZGERALD
HIV-I	GP41 TIPO O	VIROGEN

HIV-I	NEF	FITZGERALD
HIV-I	P24	FITZGERALD
HIV-I	P24 GAG	FITZGERALD
HIV-I	P24	MERIDIAN
HIV-I	GP41	MERIDIAN
HIV-I	CHIMERIC RECOMBINANT ANTIGEN	FAPON
HIV-2	GP36	MERIDIAN
HIV 2	GP36 ECTO DOMAIN	FITZGERALD
HIV 2	GP36 ENV	FITZGERALD
HIV 2	ENVELOPE	PROSPEC
HIV 2	CHIMERIC RECOMBINANT ANTIGEN	FAPON
SÍFILIS	P15	FITZGERALD
SÍFILIS	P17	FITZGERALD
SÍFILIS	P47	FITZGERALD
SÍFILIS	TPMA	FITZGERALD
SÍFILIS	RECOMBINANT TREPONEMA PALLIDUM P15 (PARTIAL)	PROSPEC
SÍFILIS	RECOMBINANT TREPONEMA PALLIDUM P17 (PARTIAL)	PROSPEC
SÍFILIS	RECOMBINANT TREPONEMA PALLIDUM P47	PROSPEC
SÍFILIS	RECOMBINANT TREPONEMA PALLIDUM P47 (PARTIAL)	PROSPEC
SÍFILIS	RECOMBINANT TREPONEMA PALLIDUM TPMA (PARTIAL)	PROSPEC
SÍFILIS	SYPHILIS CHIMERIC RECOMBINANT ANTIGEN	FAPON
HTLV-I	HTLV-I CHIMERIC RECOMBINANT ANTIGEN	FAPON
HTLV-I	ENVELOPE 701	AUSTRAL
HTLV-I	ENVELOPE 702	AUSTRAL
HTLV-I	GAG, P19	AUSTRAL
HTLV-I	GAG, P24	AUSTRAL
HTLV-I	E1	AUSTRAL
HTLV-I	P24	MERIDIAN
HTLV-I	GP21	MERIDIAN
HTLV-I	GP46	MERIDIAN
HTLV-I	ENVELOPE	PROSPEC
HTLV-I	P24 CORE	PROSPEC
HTLV-I	GP21	PROSPEC
HTLV-I	GP46	PROSPEC
HTLV-I	MOSAIC	PROSPEC
HTLV-I + II	HTLV1+2	PROSPEC
HTLV-II	ENVELOPE 802	AUSTRAL
HTLV-II	GAG, P24	AUSTRAL
HTLV-II	ENVELOPE	AUSTRAL
HBV	ANTI-HBSAG	PROSPEC, VIROSTAT, MERIDIAN, GENWAY
HBV*	HBV CORE DELTA	PROSPEC
HBV*	HBV CORE DELTA AA	PROSPEC
HIV*	HIV-1 GAG P17-P24, GP41-GP120 RECOMBINANT	PROSPEC
HIV*	HIV-1 ENVELOPE + HIV-2 GP39 RECOMBINANT	PROSPEC
HIV*	ANTI-HIV P24	PROSPEC
HTLV2	ENV	PROSPEC

4.2 AVALIAÇÃO DA LIGAÇÃO INESPECÍFICA DA MICROESFERAS CONTRA OS ANTICORPOS DAS AMOSTRAS SOROLÓGICAS

Situações que podem ocorrer naturalmente no soro de pacientes, tais como auto anticorpos ou anticorpos heterófilos, podem interferir com os ensaios na plataforma Luminex, causando um sinal de fluorescência inespecífico, promovendo alterações de sensibilidade e especificidade nos testes (WATERBOER et al., 2006).

Auto-anticorpos ou anticorpos heterófilos reagem com imunoglobulinas de mamíferos diferentes e, portanto, podem se ligar com as moléculas de captura e detecção resultante em falso positivo ou em bloqueio do sinal específico e assim interferir com os resultados de imunoensaio (Kricka, 1999; Henning et al, 2000; Kellar et al., 2001, Martins et al., 2004). Os anticorpos heterófilos podem ser encontrados em até 40% da população normal e podem ser tanto de isotipo IgG, IgM, IgA ou IgE (Kricka, 1999).

Os ensaios diagnósticos atuais apresentam índices de sensibilidade e especificidade elevados, especialmente a partir da utilização de antígenos recombinantes expressos em *E. coli*. Todavia, estes podem conduzir, em alguns casos, a resultados falsos positivos quando anticorpos presentes no soro se ligam às proteínas de *E. coli* co-purificadas com as proteínas recombinantes (MIYAKAWA et al., 2006).

Com intuito de verificar a existência de ligação entre as microesferas sem ativação com as proteínas do soro, que poderia criar um sinal inespecífico capaz de alterar a sensibilidade e especificidade do teste, foi realizado ensaio utilizando as microesferas sem ativação, com e sem a adição de extrato de *E.coli* em duas concentrações diferentes (0,1% e 1%).

TABELA 4.3 - ANÁLISE ESTATÍSTICA TESTE T PAREADO DAS MIF OBTIDAS UTILIZANDOS MICROESFERAS SEM ATIVAÇÃO, SEM E COM A ADIÇÃO DE EXTRATO DE *E.COLI* NO TAMPÃO DE ENSAIOS EM DUAS CONCENTRAÇÕES DIFERENTES (0,1% E 1%) .

TESTE T PAREADO	
VALOR DE P	< 0.0001
AS MÉDIAS SÃO SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES? (P < 0.05)	SIM

VALOR DE P, 1 OU 2 TAILED?	TWO-TAILED
DISTRIBUIÇÃO T, GRAUS DE LIBERDADE(DF)	T=4.048 DF=191
NÚMERO DE PARES	192
QUAL O TAMANHO DA DIFERENÇA?	
DIFERANÇA DAS MÉDIAS	-3.12
INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95%	-4.630 TO -1.609
R SQUARE	0.07903
QUAL É A EFICIÊNCIA DO PAREAMENTO?	
COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (R)	0.3792
VALOR DE P (ONE TAILED)	< 0.0001
O PAREAMENTO FOI SIGNIFICATIVAMENTE EFETIVO?	SIM

TABELA 4.4 - TESTE T DESPAREADO COM A CORREÇÃO DE WELCH DAS MIF OBTIDAS UTILIZANDO MICROESFERAS SEM ATIVAÇÃO, SEM E COM A ADIÇÃO DE EXTRATO DE *E. COLI* NO TAMPÃO DE ENSAIOS EM DUAS CONCENTRAÇÕES DIFERENTES (0,1% E 1%)

TEST T DESPAREADO COM A CORREÇÃO DE WELCH

VALOR DE P	0.0002
AS MÉDIAS SÃO SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES? (P < 0.05)	SIM
VALOR DE P, 1 OU 2 TAILED?	TWO-TAILED
DISTRIBUIÇÃO T, GRAUS DE LIBERDADE(DF)	T=3.732 DF=207
QUAL O TAMANHO DA DIFERENÇA?	
MÉDIA ± SEM OF COLUMN F	7.854 ± 0.1692 N=192
MÉDIA ± SEM OF COLUMN G	10.97 ± 0.8187 N=192
DIFERANÇA DAS MÉDIAS	-3.120 ± 0.8360
INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95%	-4.758 TO -1.481
R SQUARE	0.06303
TEST F PARA COMPARAR AS VARIANCIAS	
F,DFN, DFD	23.40, 191, 191
VALOR DE P	< 0.0001
AS VARIANCIAS SÃO SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES?	SIM

Ao analisar os dois grupos, mostra que existe uma diferença estatisticamente significativa entre as condições testadas, indicando que as microesferas não ativadas podem ligar proteínas do soro de maneira inespecífica.

4.3 ENSAIO MICROESFERA “ATIVADA” NÃO ACOPLADA COM USO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TAMPÃO 1%, 0,1% E SEM EXTRATO DE *E. COLI*

Para verificar a capacidade das microesferas de ligar as proteínas do soro após o processo de ativação, ou seja, se ao final do processo ainda existem sítios que permanecem ativados nas microesferas permitindo a ligação de proteínas do soro. O ensaio foi realizado utilizando as microesferas que sofreram o processo de ativação e com a adição de extrato de *E.coli* como bloqueador no tampão de ensaio nos duas concentrações diferentes, 0,1% e 1%.

TABELA 4.5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA TESTE T PAREADO DAS MIF OBTIDAS UTILIZANDOS MICROESFERAS COM ATIVAÇÃO, SEM E COM A ADIÇÃO DE EXTRATO DE *E.COLI* NO TAMPÃO DE ENSAIOS EM DUAS CONCENTRAÇÕES DIFERENTES (0,1% E 1%) .

TEST T PAREADO	
VALOR DE P	0.7957
AS MÉDIAS SÃO SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES? (P < 0.05)	NÃO
VALOR DE P, 1 OU 2 TAILED?	TWO-TAILED
DISTRIBUIÇÃO T, GRAUS DE LIBERDADE(DF)	T=0.2593 DF=191
NÚMERO DE PARES	192
QUAL O TAMANHO DA DIFERENÇA?	
DIFERANÇA DAS MÉDIAS	-0.09115
INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95%	-0.7801 TO 0.5978
R SQUARE	0.0003519
QUAL É A EFICIÊNCIA DO PAREAMENTO?	
COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (R)	0.8453
VALOR DE P (ONE TAILED)	< 0.0001
O PAREAMENTO FOI SIGNIFICATIVAMENTE EFETIVO?	SIM

TABELA 4.6 - TESTE T DESPAREADO COM A CORREÇÃO DE WELCH DAS MIF OBTIDAS UTILIZANDOS MICROESFERAS COM ATIVAÇÃO, SEM E COM A ADIÇÃO DE EXTRATO DE *E.COLI* NO TAMPÃO DE ENSAIOS EM DUAS CONCENTRAÇÕES DIFERENTES (0,1% E 1%)

TEST T DESPAREADO COM A CORREÇÃO DE WELCH	
VALOR DE P	0.9175
AS MÉDIAS SÃO SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES? (P < 0.05)	NÃO
VALOR DE P, 1 OU 2 TAILED?	TWO-TAILED
DISTRIBUIÇÃO T, GRAUS DE LIBERDADE(DF)	T=0.1037 DF=377
QUAL O TAMANHO DA DIFERENÇA?	
MÉDIA ± SEM OF COLUMN F	19.17 ± 0.5859 N=192
MÉDIA ± SEM OF COLUMN G	19.26 ± 0.6551 N=192
DIFERANÇA DAS MÉDIAS	-0.09115 ± 0.8789
INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95%	-1.814 TO 1.631
R SQUARE	0.00002853
TEST F PARA COMPARAR AS VARIANCIAS	
F,DFN, DFD	1.250, 191, 191
VALOR DE P	0.1237

AS VARIANCIAS SÃO SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES?	NÃO
--	-----

Ao analisar os resultados dos dois grupos as MFIa obtidas demonstram que uma vez as microesferas passam pelo processo de ativação e bloqueio não existem sítios ativados remanescentes que ligam de forma não específica as proteínas das amostras. Como não houve diferenças estatisticamente significativas entre as amostras com e sem a presença do bloqueio de *E.coli* pode-se concluir que as microesferas com ativação bloqueadas ou sem ativação não possuem a capacidade de ligar as proteínas do soro de maneira inespecífica.

4.4 DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE ANTICORPOS ANTI-BACTERIA NOS SOROS HUMANOS

Para avaliação da presença de anticorpos anti-bactéria nos soros foram utilizadas as microesferas acopladas ao extrato de *E.coli* 50µg/ml na presença ou ausência de extrato de *E.coli* no Tampão de Diluição;

TABELA 4.7 - ANÁLISE ESTATÍSTICA TESTE T PAREADO DAS MIF OBTIDAS UTILIZANDOS MICROESFERAS COM ATIVAÇÃO, SEM E COM A ADIÇÃO DE EXTRATO DE *E.COLI* NO TAMPÃO DE ENSAIOS EM DUAS CONCENTRAÇÕES DIFERENTES (0,1% E 1%) .

TEST T PAREADO	
VALOR DE P	< 0.0001
AS MÉDIAS SÃO SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES? (P < 0.05)	SIM
VALOR DE P, 1 OU 2 TAILED?	TWO-TAILED
DISTRIBUIÇÃO T, GRAUS DE LIBERDADE(DF)	T=14.10 DF=191
NÚMERO DE PARES	192
QUAL O TAMANHO DA DIFERENÇA?	
DIFERANÇA DAS MÉDIAS	928
INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95%	799.0 TO 1057
R SQUARE	0.51
QUAL É A EFICIÊNCIA DO PAREAMENTO?	
COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (R)	0.5344
VALOR DE P (ONE TAILED)	< 0.0001
O PAREAMENTO FOI SIGNIFICATIVAMENTE EFETIVO?	SIM

TABELA 4.8 - TESTE T DESPAREADO COM A CORREÇÃO DE WELCH DAS MIF OBTIDAS UTILIZANDO MICROESFERAS COM ATIVAÇÃO, SEM E COM A ADIÇÃO DE EXTRATO DE *E. COLI* NO TAMPÃO DE ENSAIOS EM DUAS CONCENTRAÇÕES DIFERENTES (0,1% E 1%)

TEST T DESPAREADO COM A CORREÇÃO DE WELCH	
VALOR DE P	< 0.0001
AS MÉDIAS SÃO SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES? (P < 0.05)	SIM
VALOR DE P, 1 OU 2 TAILED?	TWO-TAILED
DISTRIBUIÇÃO T, GRAUS DE LIBERDADE(DF)	T=13.68 DF=192
QUAL O TAMANHO DA DIFERENÇA?	
MÉDIA ± SEM OF COLUMN F	990.4 ± 67.72 N=192
MÉDIA ± SEM OF COLUMN G	62.40 ± 3.689 N=192
DIFERANÇA DAS MÉDIAS	928.0 ± 67.82
INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95%	795.1 TO 1061
R SQUARE	0.4937
TEST F PARA COMPARAR AS VARIANCIAS	
F,DFN, DFD	336.9, 191, 191
VALOR DE P	< 0.0001
AS VARIANCIAS SÃO SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES?	SIM

A partir do MIF obtidas foi realizada uma comparação estatística para determinar se as diferenças obtidas eram significativas. A partir da análise de Welch foi possível determinar que a diferença entre as MIF obtidas era estatisticamente significativa. Na Figura 4.1 onde está o scatter plot dos dois ensaios pode ser avaliada a diferença da distribuição dos MIF obtidos. Mesmo com o bloqueio ainda se obtém sinais significativos mostrando que os soros do painel tem reatividade específica contra proteínas bacterianas e que esta reatividade potencialmente pode causar problemas quando utilizados contra proteínas recombinantes com baixa qualidade na purificação. Também existe diferença estatisticamente significativa no uso do extrato de *E. coli* para bloqueio de anticorpos contra bactérias, e finalmente diferença significativa entre o uso do tampão contendo 1% e 0,1% de soro fetal bovino (BSA). O aumento da concentração do BSA (1%) diminuiu consideravelmente os sinais.

Assim, a partir dos resultados obtidos podemos avaliar que o extrato de *E. coli* bloqueia os sítios inespecíficos presentes nos antígenos utilizados e adicionalmente que o uso do tampão de ensaio com BSA 1% diminui sinal inespecífico nos ensaios.

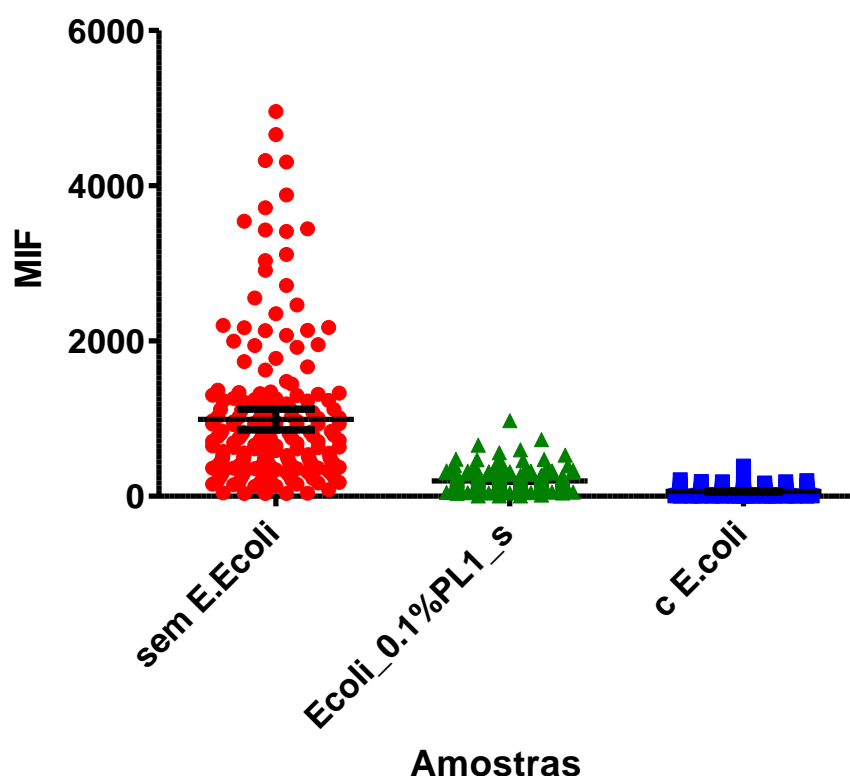


FIGURA 4.1 - SCATTER PLOT COM 95%IC DAS MIF DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ENSAIO AVALIADAS, ENSAIOS NA PRESENÇA SEM A ADIÇÃO DE EXTRATO DE E.COLI, COM A ADIÇÃO DE EXTRATO DE E.COLI 0,1% E COM EXTRATO DE E.COLI 1%.

4.5 OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO PADRÃO

4.5.1 Análises ROC das diferentes condições avaliadas

Com o objetivo de reduzir o tempo de ensaio padrão foram realizadas variações das condições do ensaio padrão. Desta forma foram avaliadas a temperatura de incubação, tempo de incubação, volumes de lavagem, e números de lavagem. Como essas condições podem afetar o valor de MFI obtidos, através de ligações inespecíficas, os valores alterados nas amostras negativas podem alterar os valores de cutoff, consequentemente os valores de sensibilidade e especificidade. Para tanto o valor de cutoff foi utilizado como parâmetro para determinação das melhores condições de ensaio.

TABELA 4.9 - COMPARAÇÃO DE CUTOFF DAS ANÁLISES ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS

	HCV MAG	HTLV 1 P24	HTLV 2 P21	HTLV ENV	LIS ADO	CRA FRA	HIV BIO	SIF P17	SIF P47	SIF TMP A	HIV P24
ENSAIO PADRÃO	298	771	599	246	1465	850	487 3	462 6	572 5	2220	734 6
2 INC 37C 20 MIN	119	530	404	172	1513	855	364 7	365 3	451 8	1647	574 7
2 INC 37C 15 MIN	216	831	579	235	1558	1589	388 6	546 0	546 0	1725	761 6
2 INC 37C 10 MIN	237	514	387	162	1266	744	385 6	384 2	480 4	2220	553 4
2 INC 42C 30 MIN	358	811	600	242	1795	1097	553 4	723 9	873 9	3705	110 84
2 INC 42C 20 MIN	270	396	214	275	1586	1012	418 3	533 9	680 5	2788	837 3
2 INC 42C 10 MIN	209	752	530	207	1269	758	395 9	405 8	498 7	2242	573 3
1 INC 37C 20 MIN	442	529	403	172	1326	855	364 7	365 3	451 8	1647	574 7
1 INC 37C 10 MIN	215	705	499	182	864	801	283 3	484 5	602 7	2249	546 4
1 INC 42C 30 MIN	310	937	654	258	1417	1096	481 3	657 1	809 9	2009	824 3
1 INC 42C 20 MIN	204	620	404	120	1038	938	258 2	440 4	561 4	2184	569 5
1 INC 42C 10 MIN	202	498	330	135	939	935	308 7	462 6	598 4	2004	640 6
1 LAV 100µL 1X	205	756	528	198	1383	1240	357 1	578 1	674 7	2811	808 5
1 LAV 200µL 1X	127	606	433	150	1250	968	289 2	336 0	434 3	1584	593 6
2 LAV 100µL 1X	277	726	560	206	1278	942	282 8	523 3	647 7	2800	648 4
2 LAV 200µL 1X	284	1026	712	267	1223	943	489 7	587 1	711 6	3030	864 4
2 LAV SEM LAV	446	1452	1028	405	1947	1672	577 5	887 6	107 47	2668	110 90

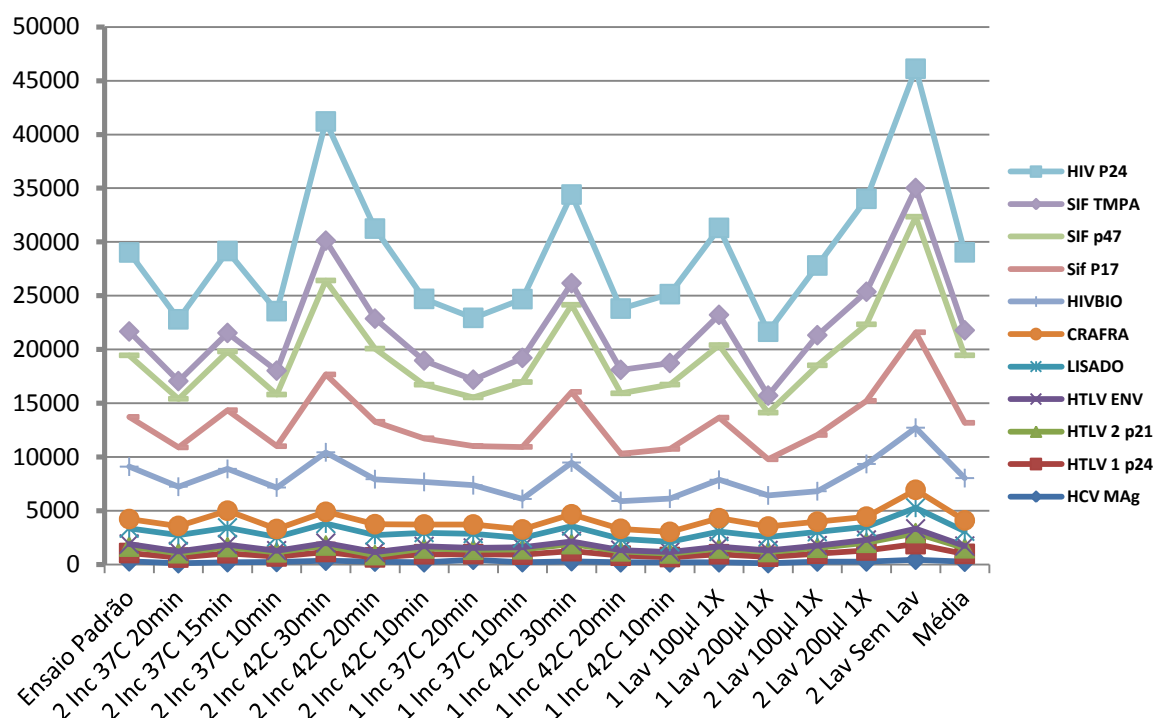


FIGURA 4.2 - COMPARAÇÃO DE CUTOFF DAS ANÁLISES ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS

Os resultados a partir da análise dos cutoff obtidos mostraram (Figura 4.2) que os ensaio padrão pode ser melhorado (Figura 4.4 A) nota-se que um menor tempo de incubação tanto no primeira como na segunda incubação, assim como, a manutenção da temperatura de 37 °C, e uma lavagem com volumes de 200 µl, melhoram o ensaio, apresetando um menor valor de cutoff. Assim, o ensaio foi otimizado para incubações para 15 minutos e redução do númro de lavagens, o que levaram na redução de 1 hora no ensaio padrão (Figura 4.4 B).

4.5.2 Otimização do tempo de análise

O tempo de duração da análise para cada poço pode ser controlado pelo software xPonent que comanda o equipamento Luminex 200. Segundo a recomendação do fabricante para que um poço da microplaca seja estatisticamente válido é necessário que este conte ao menos 35 microesferas de cada código, porém para que se tenha uma maior confiança o fabricante sugere que sejam lidas

100 microesferas no poço, sendo 60" o recomendado pelo fabricantes por poço. Com esta análise avaliamos o tempo de aquisição a fim de determinar o menor tempo necessário para contar as 100 microesferas como recomendado pelo fabricante, para tanto utilizamos diferentes quantidades iniciais de microesferas, assim como, diferentes tempos de aquisição.

TABELA 4.10 - NÚMERO DE MICROESFERAS OBTIDAS NOS DIFERENTES PARÂMETROS DE AQUISIÇÃO

	5000 MICROESFERAS				4000 MICROESFERAS			
TEMPO	40"	30"	20"	10"	40"	30"	20"	10"
T. DE ENSAIO	127	131	146	140	135	142	128	130
	3000 MICROESFERAS				2000 MICROESFERAS			
TEMPO	40"	30"	20"	10"	40"	30"	20"	10"
SHEATHFLUID	135	141	136	125	133	128	126	92

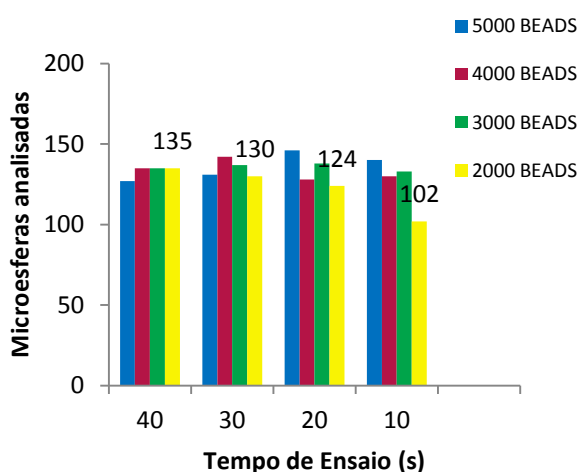


FIGURA 4.3 – GRÁFICOS DO RESULTADO DA CONTAGEM DAS BEADS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPO EM SEGUNDOS E NÚMERO INICIAL DE MICROESFERAS DILUÍDAS POR POÇOS (BARRAS COLORIDAS).

Percebe-se que é possível a redução de tempo de contagem para 30 segundos sem prejuízo para o ensaio, ou seja uma redução de metade do tempo em relação ao ensaio padrão proposto pelo fabricante.

A partir da análise dos resultados foi estabelecido o novo ensaio padrão como mostrado na (Figura 4.4.

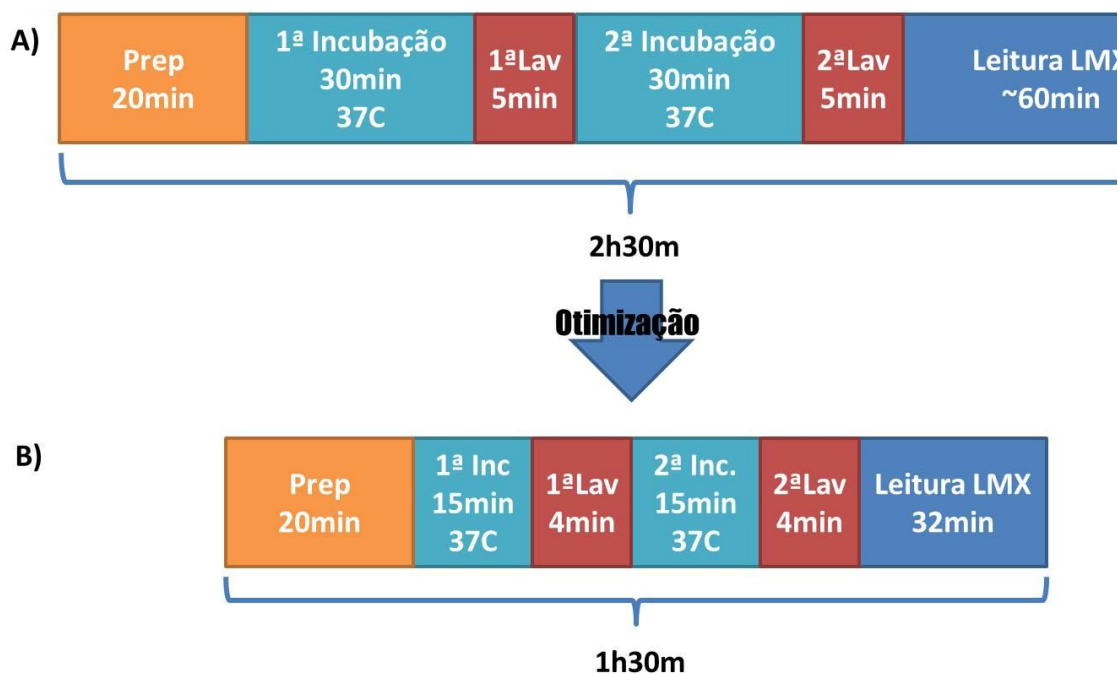


FIGURA 4.4 – OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO PADRÃO RECOMENDADO PELO FABRICANTE B) MOSTRA O ENSAIO OTIMIZADO COM A REDUÇÃO DE UMA HORA DE ENSAIO

4.6 ACOPLAMENTOS DOS ANTÍGENOS PARA AS DOENÇA DE CHAGAS

4.6.1 Chagas Antígeno CRAFRA

Dois antígenos recombinantes, CRA (antígeno repetitivo citoplasmático) e FRA (antígeno repetitivo flagelar), foram descritos para a aplicação em teste de diagnóstico para a doença de Chagas (KRIEGER, M. A. et al., 1992a). Estes antígenos são estruturalmente compostos por repetições de epitopos (KRIEGER, M. A. et al., 1990; LAFAILLE et al., 1989b). FRA está localizado no flagelo do *T. cruzi* e exibe uma repetição de 68 aminoácidos, enquanto CRA é distribuído por todo o citoplasma e tem uma repetição de 14 aminoácidos (LAFAILLE et al., 1989a). O teste desenvolvido com a aplicação destes antígenos foi do tipo ELISA, e indicou que antígenos recombinantes apresentaram melhores resultados quando usado em combinação do que separadamente. Além disso, os resultados indicaram que o

imunoensaio empregando o antígeno recombinante (CRA+FRA) era melhor do que o ELISA convencional no diagnóstico da doença de Chagas, apresentando 100% de especificidade e sensibilidade em todos os soros (ALMEIDA et al., 1990; KRIEGER, M. A. et al., 1992b). A fim de determinar a melhor condição de acoplamento do antígeno CRAFRA as ME (Microesferas) foram utilizadas em diferentes tampões e concentrações de antígeno. O antígeno CRAFRA foi acoplado utilizando os tampões PBS nas concentrações de 50 e 100 µg/ml, MES a 50 µg/ml e CARBO 75, 100 e 125 µg/ml. As ME acopladas foram testadas utilizando o painel de amostras AEQ.

Os resultados de MIF obtidos das amostras utilizadas nos ensaios foram avaliados pela análise da curva ROC para determinar qual a área sob a curva (Area Under Curve – AUC) e valor de cutoff que permitisse determinar a maior sensibilidade e especificidade dos testes.

Os resultados obtidos das diferentes condições de acoplamento descritos na (FIGURA 4.5) e na (Tabela 4.11) tiveram respectivamente os seguintes valores de area under the curve (AUC), de cutoff, sensibilidade e especificidade: MES 50 µg/ml 0,9945, 43, 100% e 91,14%; PBS 50 µg/ml 0,9432, 51, 96,8% e 48,1%; PBS 100 µg/ml 0,9933, 27, 100% e 89,9%; CARBO 75 µg/ml 0,89,51, 17, 90,3% e 63,9%; CARBO100 µg/ml 0,9976, 93, 100% e 94,3% e CARBO 125 µg/ml 0,8432, 21, 90,3% e 17,7%.

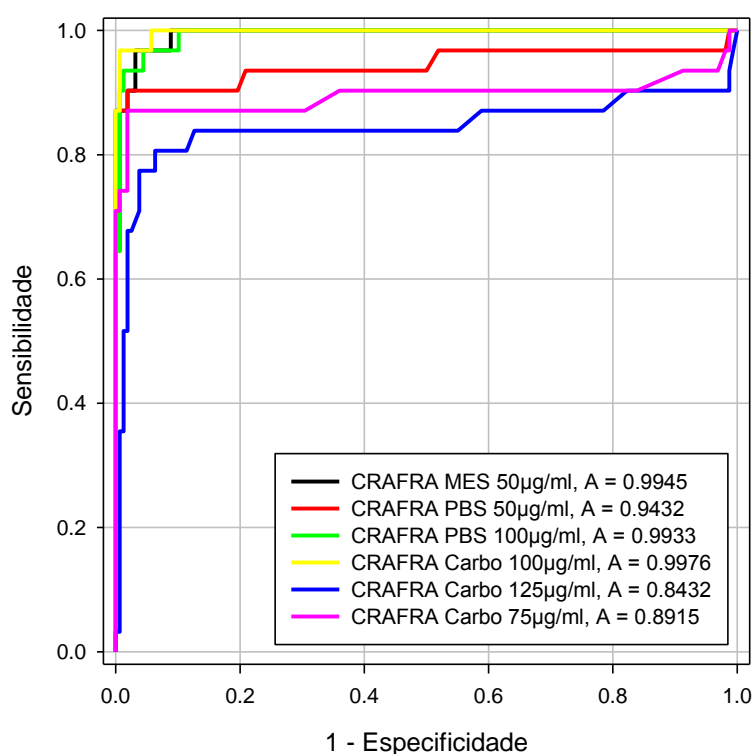


FIGURA 4.5 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ACOPLAMENTOS DE CRAFRA; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC

A partir da análise dos resultados consolidados na Tabela 4.5, as condições MES 50 µg/ml e CARBO 100 µg/ml apresentaram os melhores resultados, pois apresentaram os maiores valores de AUC, assim como, de sensibilidade/especificidade. Foi escolhido o 100µg/ml em CARBO como a melhor condição de acoplamento para o multiteste por esta apresentar uma AUC de 0,9976, cutoff 93, sensibilidade 100% e especificidade 94,3%. Quando comparamos as curvas ROC e suas AUC dos resultados obtidos no gráfico A da (FIGURA 4.5) observa-se a diferença entre estas mostrando que realmente a condição escolhida tem um desempenho melhor que as outras.

TABELA 4.11 – RESULTADO ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO CRAFTA

DOENÇA	CHAGAS	CHAGAS	CHAGAS	CHAGAS	CHAGAS	CHAGAS
ANTÍGENO	CRAFTA	CRAFTA	CRAFTA	CRAFTA	CRAFTA	CRAFTA
TAMPÃO	MÊS	PBS	PBS	CARBO	CARBO	CARBO
[ACOPLAMENTO]	50µG/ML	50 µG/ML	100 µG/ML	100 µG/ML	125 µG/ML	75 µG/ML
CUTOFF	43	51	27	93	21	17
NEGATIVOS	158	158	158	158	158	158
NEGATIVOS VERDADEIROS	144	76	142	149	28	101
POSITIVOS	31	31	31	31	31	31
POSITIVOS VERDADEIROS	31	30	31	31	28	28
FALSO POSITIVOS	14	82	16	9	130	57
SENSIBILIDADE	100.00%	96.8%	100.0%	100.0%	90.3%	90.3%
ESPECIFICIDADE	91.14%	48.1%	89.9%	94.3%	17.7%	63.9%
TOTAL AMOSTRAS	189	189	189	189	189	189
ÁREA DA CURVA ROC	0.9945	0.9432	0.9933	0.9976	0.8432	0.8951
DESVIO PADRÃO	0.0037	0.0351	0.0044	0.0022	0.0580	0.0507
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	0.9873 ATÉ 1.002	0.8745 ATÉ 1.012	0.9847 ATÉ 1.0	0.9933 ATÉ 1.0	0.7295 ATÉ 0.9	0.7957 ATÉ 0.994
VALOR DE P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

4.6.2 Antígeno Chagas Lisado

O lisado de Chagas é composto pelas proteínas contidas no sobrenadante da cultura de *Trypanosoma cruzi* lisada através de ultrassom e posteriormente centrifugada. Este antígeno é produzido por Bio-Manguinhos/FIOCRUZ seguindo as boas práticas de fabricação e foi fornecido para avaliação neste projeto.

A fim de determinar a melhor condição de acoplamento do antígeno lisado as ME (Microesferas) foram utilizadas diferentes tampões e concentrações de antígeno. O antígeno lisado foi acoplado utilizando os tampões PBS nas concentrações de 50, 100 e 125µg/ml, e CARBO 75, 100 e 125 µg/ml. As ME acopladas foram testadas utilizando o painel de amostras AEQ.

Os resultados obtidos das diferentes condições de acoplamento descritos (FIGURA 4.6) e na (Tabela 4.12) tiveram respectivamente os seguintes valores de AUC, de cutoff, sensibilidade e especificidade: PBS 50µg/ml, 1.00, 270, 100% e 100%; PBS 100 µg/ml, 0.9996, 59, 100% e 98.7% e PBS 125 µg/ml, 0.9992, 175, 100% e 97.5%, e CARBO 75 µg/ml, 1.00, 80, 100% e 100%, CARBO 100 µg/ml, 1.00, 146, 100% e 100% e CARBO 125 µg/ml, 1.00, 54, 100% e 100%.

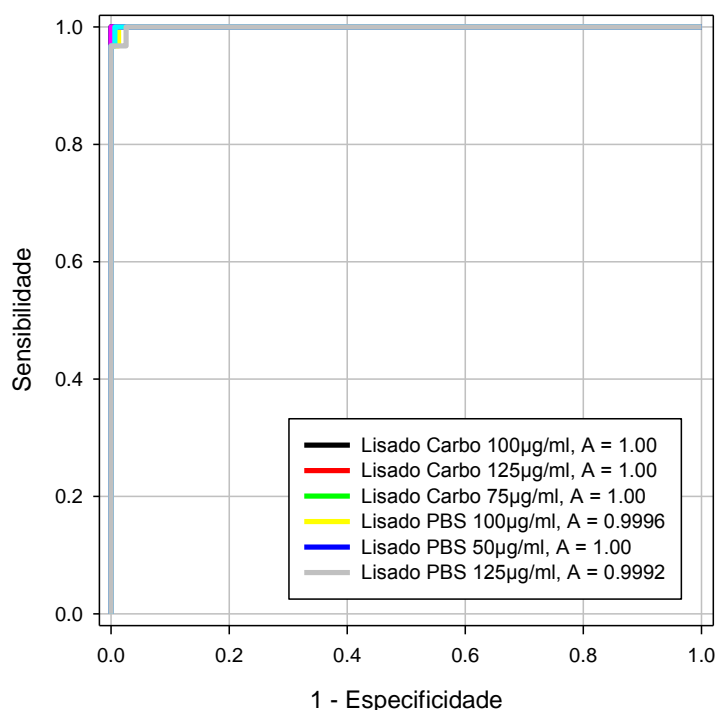


FIGURA 4.6- GRÁFICO DAS CURVAS ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO CHAGAS LISADO; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.

A partir da análise dos resultados consolidados na Tabela 4.12 as condições PBS 50 µg/ml e CARBO 75, 100 e 125 µg/ml apresentaram os melhores resultados com 100%/100% sensibilidade e especificidade. Foi escolhido a condição de PBS 50 µg/ml como a melhor condição de acoplamento para o multitestado por esta apresentar uma AUC de 1.00, cutoff 270, sensibilidade 100% e especificidade 100%. Quando comparamos as curvas ROC e suas AUC dos resultados obtidos no gráfico A na (FIGURA 4.6) observa-se que estas se sobrepõem mostrando que o resultados obtidos tiveram performance estatisticamente semelhantes.

TABELA 4.12 - RESULTADO ACOPLAMENTOS ANTIGENO LISADO

DOENÇA	CHAGAS	CHAGAS	CHAGAS	CHAGAS	CHAGAS	CHAGAS
ANTÍGENO	LISADO	LISADO	LISADO	LISADO	LISADO	LISADO
TAMPÃO	CARBON ATO	CARBON ATO	CARBON ATO	PBS	PBS	PBS
[ACOPLAMENTO]	100 µG/ML	125 µG/ML L	75 µG/ML	100 µG/ ML	50 µG/ML	125 µG/ML
CUTOFF	146	54	80	59	270	175
NEGATIVOS	158	158	158	157	151	158
NEGATIVOS VERDADEIROS	158	158	158	155	151	154
POSITIVOS	31	28	28	31	27	31
POSITIVOS VERDADEIROS	31	28	28	31	27	31
FALSO POSITIVOS	0	0	0	2	0	4
SENSIBILIDADE	100.00%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
ESPECIFICIDADE	100.00%	100.0%	100.0%	98.7%	100.0%	97.5%
TOTAL AMOSTRAS	189	186	186	188	178	189
ÁREA DA CURVA ROC	1.0000	1.0000	1.0000	0.9996	1.0000	0.9992
DESVIO PADRÃO	0.0000	0.0000	0.0000	0.0006	0.0000	0.0018
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	1.000 ATÉ 1.0000	1.000 ATÉ 1.0000	1.000 ATÉ 1.0000	0.9985 ATÉ 1.000	1.000 ATÉ 1.000	0.9973 ATÉ 1.000
VALOR DE P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

4.6.3 Antígeno Chagas Multiantígeno

O multi-antígeno de Chagas (MAg) é uma proteína recombinante produzida em *E. coli*, cuja cadeia protéica contém 87 aminoácidos e corresponde aos epitopos PEP-2, TcD, TcE e SAPA. O epítipo PEP-2 é uma sequência de 22 aa de extensão contendo uma repetição de 12 aa com mais 10 aa da mesma repetição e tem uma reatividade complementar a TcD. O epítipo TcD contém 15 aa de extensão com uma repetição e meia de 10 aa com ótima reatividade com os anticorpos anti *T. cruzi* do soro. O epítipo TcE tem 21 aa de extensão e é composto por 3 repetições de 7 aa. E finalmente, antígeno liberado na fase aguda ou shed acute phase antigen (SAPA) é composto por duas repetições de 12 aa em sua cadeia (BUSCAGLIA et al., 2006; SILVEIRA, DA et al., 2001b).

A fim de determinar a melhor condição de acoplamento do antígeno Multiantígeno as ME (Microesferas) foram utilizadas diferentes tampões e concentrações de antígeno. O antígeno Multiantígeno foi acoplado utilizando os tampões CARBO nas concentrações de 20 µg/ml, MES nas concentrações de 20 µg/ml e PBS 20, 75 e 125 µg/ml. As ME acopladas foram testadas utilizando o painel de amostras AEQ.

Os resultados de MIF obtidos dos ensaios foram avaliados pela análise da curva ROC para determinar qual a AUC (área embaixo da curva) e valor de cutoff que permitisse determinar a maior sensibilidade e especificidade dos testes.

Os resultados obtidos das diferentes condições de acoplamento descritos na (FIGURA 4.7) e na (Tabela 4.13) tiveram respectivamente os seguintes valores de AUC, de cutoff, sensibilidade e especificidade: CARBO 20 µg/ml 0.9998, 233, 100% e 99.37%, MÊS 20 µg/ml, 0.9742, 51, 100% e 48.1%, PBS 20 µg/ml 0.998, 426, 100% e 99.4%, PBS 75 µg/ml 0.9986, 83, 100%, 96.8% e PBS125 µg/ml 0.9986, 137, 100% e 98,1%.

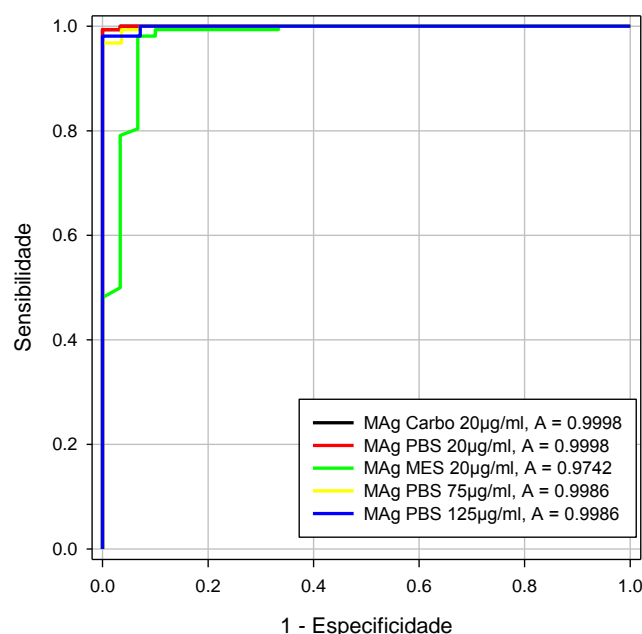


FIGURA 4.7 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO CHAGAS MULTIANTÍGENO; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC

A partir da análise dos resultados consolidados na (Tabela 4.7) as condições PBS 20 µg/ml e CARBO 20 µg/ml apresentaram os melhores resultados com 100%/99.4% sensibilidade e especificidade. Para poder escolher a melhor condição de acoplamento utilizamos a intensidade dos MIF obtidos valor do cutoff e a variação das amostras. Foi escolhido a condição de PBS 20 µg/ml como a melhor condição de acoplamento para o multiteste por está apresentar uma AUC de 0.998, cutoff 426, sensibilidade 100% e especificidade 99.4%, o que corresponde a um falso positivo.

Ao comparar as curvas ROC e suas AUC dos resultados obtidos no gráfico A na (FIGURA 4.7) observa-se que estas se sobrepõem mostrando que o resultados obtidos tiveram performance estatisticamente semelhantes, exceto pelo chagas MES 20 µg/ml. A diferença entre estas mostrando que realmente a condição escolhida tem um desempenho melhor que as outras quanto a sua capacidade de determinar a diferença entre as amostras.

TABELA 4.13 RESULTADO ACOPLAMENTOS ANTÍGENO MULTIANTÍGENO

DOENÇA	CHAGAS	CHAGAS	CHAGAS	CHAGAS	CHAGAS
ANTÍGENO	MAG	MAG	MAG	MAG	MAG
TAMPÃO	CARBO	PBS	MÊS	PBS	PBS
[ACOPLAMENTO]	20µG/ML	20µG/ML	20µG/ML	75µG/ML	125µG/ML
CUTOFF	233	426	51	83	137
NEGATIVOS	158	158	158	158	158
NEGATIVOS VERDADEIROS	157	157	76	153	155
POSITIVOS	30	30	30	28	28
POSITIVOS VERDADEIROS	30	30	30	28	28
FALSO POSITIVOS	1	1	82	5	3
SENSIBILIDADE	100.00%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
ESPECIFICIDADE	99.4%	99.4%	48.1%	96.8%	98.1%
TOTAL AMOSTRAS	188	188	188	186	186
ÁREA DA CURVA ROC	0.9998	0.9998	0.9742	0.9986	0.9986
DESVIO PADRÃO	0.0004	0.0004	0.0180	0.001412	0.0013
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	0.9991 ATÉ 1.00	0.9991 ATÉ 1.00	0.9389 ATÉ 1.009	0.9959 ATÉ 1.001	0.9961 ATÉ 1.001
VALOR DE P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

4.6.4 Comparação entre as melhores condições dos antígenos de Chagas

A fim de determinar o melhor antígeno ou a combinação de antígenos para o se obter o melhor teste os melhores resultados dos acoplamentos CRAFT CARBO 100µg/ml, Lisado PBS 50µg/ml e Multiantígeno 20µg/ml Tabela 4.14 FIGURA 4.9 tiveram seus melhores resultados comparados entre si.

TABELA 4.14 ANÁLISE ROC DOS MELHORES ANTÍGENOS PARA CONFIRMAR DOENÇA DE CHAGAS

DOENÇA	CHAGAS	CHAGAS	CHAGAS
ANTÍGENO	CRAFT	LISADO	MAG
TAMPÃO	CARBONATO	PBS	PBS
[ACOPLAMENTO]	100µG/ML	50µG/ML	20µG/ML
CUTOFF	92	270	426
NEGATIVOS	158	151	158
NEGATIVOS VERDADEIROS	149	151	157
POSITIVOS	31	27	31
POSITIVOS VERDADEIROS	31	27	31

FALSO POSITIVOS	9	0	1
TOTAL AMOSTRAS	189	178	189
SENSIBILIDADE	100.0%	100.0%	100.0%
ESPECIFICIDADE	94.3%	100.0%	99.4%
TAXA DE FALSO POSITIVOS	5,7%	0%	1%
ACURÁCIA	94,3%	100.0%	99%
PRECISÃO	78%	100.0%	97%
VALOR PREDITIVO NEGATIVO	100%	100.0%	100%
ÁREA DA CURVA ROC	0.9976	1.0000	0.9998
DESVIO PADRÃO	0.002172	0.0000	0.000361
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	0.9933 ATÉ 1.0002	1.000 ATÉ 1.000	0.9991 ATÉ 1.000
VALOR DE P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

A comparação (Tabela 4.15) entre os resultados das curvas ROC do CRAFTRA X LISADO, CRAFTRA x MULTIANTÍGENO e LISADO x MULTIANTÍGENO apresentaram uma diferença de área de resultados pequena entre todas as comparações, mostrando a semelhança entre os resultados obtidos entre os antígenos. A comparação LISADO x MULTIANTÍGENO apresentou os menores valores de diferença de área= 0,000211, menor erro padrão=0,000361, indicando uma semelhança entre os dois antígenos. Porém, ao se olhar o valor de $P=0,5585$ percebe-se que a utilização dos antígenos combinados não traz um ganho para o ensaio do ponto de vista estatístico.

TABELA 4.15 - COMPARAÇÃO DAS CURVAS ROC

COMPARAÇÃO CURVAS ROC			
	CRAFTRA X LISADO	CRAFTRA X MAG	LISADO X MAG
DIFERENÇA DE ÁREA	-0.002450	-0.002239	0.000211
ERRO PADRÃO	0.002172	0.002202	0.000361
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	-0.006707 ATÉ 0.001807	-0.006554 ATÉ 0.002076	-0.000496 ATÉ 0.000918
ESTATÍSTICA Z	-1.128	-1.017	0.5851
VALOR DE P	0.2593	0.3092	0.5585

Valor de Z positivo e Valor de P mais próximo a 100%

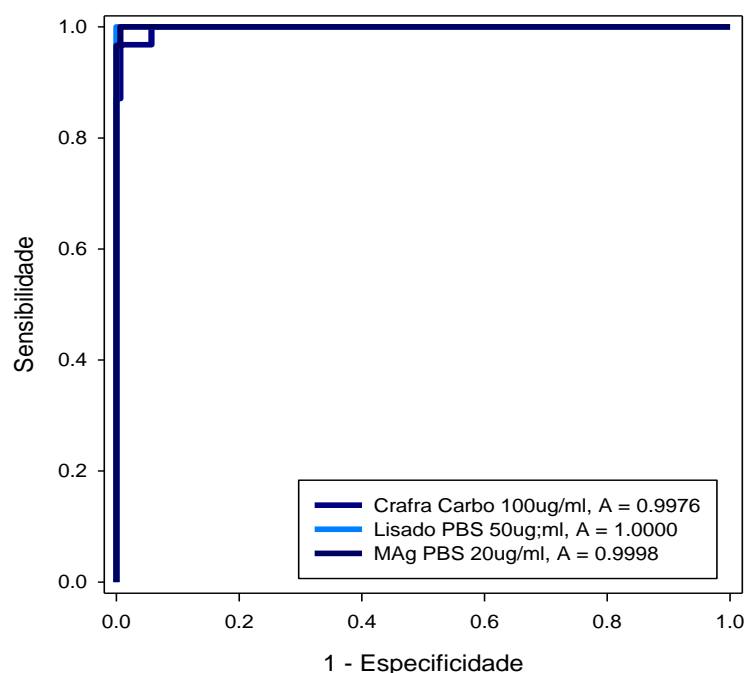


FIGURA 4.8 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS MELHORES CONDIÇÕES DE ACOPLAMENTOS DOS ANTÍGENOS DE CHAGAS; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC

Porém, do ponto de vista biológico ou funcional do teste os dois antígenos funcionam como backup um do outro e melhoram a acurácia e precisão do ensaio, permitindo ter uma maior confiança dos resultados obtidos. Essa afirmação fica clara quando realizada uma análise de Combinação Antígeno + Antígeno Tabela 4.16 onde os resultados de sensibilidade/especificidade e acurácia/precisão são respectivamente para CRAFTA X LISADO 100%/94.3%, 94,3/75; CRAFTA x MULTIANTÍGENO 100%/100% e 94,3% e 78%; LISADO x MULTIANTÍGENO 100%/99,4% e 99/4%/96.4% (FIGURA 4.9). A combinação de Lisado com o Multiantígeno leva a um melhor teste, de modo que foi definido que serão utilizados os antígenos Lisado PBS 50µg/ml e Chagas Multiantígeno 20µg/ml para o multiteste.

TABELA 4.16 - COMBINAÇÃO ANTÍGENO + ANTÍGENO

COMBINAÇÃO ANTÍGENO + ANTÍGENO			
	CRAFTA + LISADO	CRAFTA + MAG	LISADO + MAG

POS VER	27	31	27
NEG VER	149	149	150
POS FAL	9	9	1
NEG FAL	0	0	0
	185	189	178
SENSIBILIDADE	100.00%	100.0%	100.0%
ESPECIFICIDADE	94.30%	94,3%	99,4%
TAXA DE FALSO POSITIVOS	5,7%	5,7%	1%
ACURÁCIA	94,3%	94,3%%	99,4%
PRECISÃO	75%	78%	96,4%
VALOR PREDITIVO NEGATIVO	100%	100.0%	100%

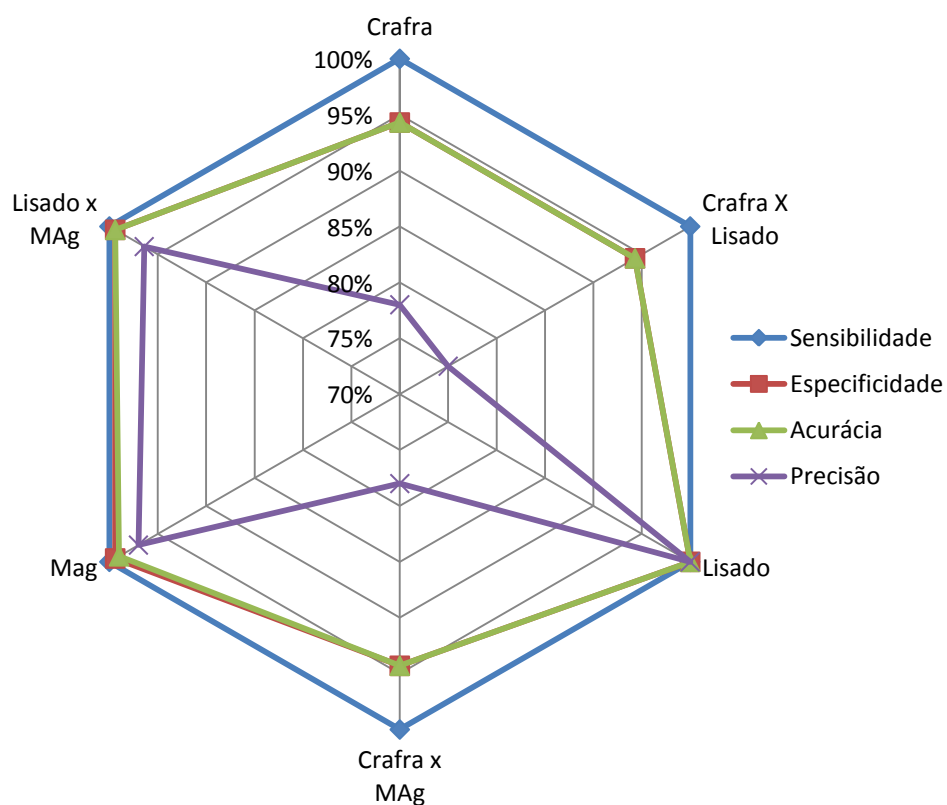


FIGURA 4.9 ANÁLISE DE COMBINAÇÃO ANTÍGENO + ANTÍGENO DE CHAGAS, GRÁFICO DAS PARÂMETROS OBTIDOS DA ANÁLISE DE CONTINGÊNCIA COM OS PARÂMETROS UTILIZADOS PARA AVALIAR A COMBINAÇÃO DOS ANTÍGENOS

4.7 ACOPLAMENTOS DOS ANTÍGENOS PARA HBV

4.7.1 Antígeno HBV Core Fitzgerald

Os resultados obtidos das diferentes condições de acoplamento descritos na FIGURA 4.10 e na Tabela 4.17 obtiveram um valor de AUC, de cutoff, sensibilidade e especificidade: CARBO 50µg/ml: 0,7973, 19, 81.1% e 53.3%; PBS 50µg/ml: 0,9124, 30, 91.9% e 80.3%; MES 50µg/ml: 0,9419, 15, 87.5% e 79.2%; PBS 100 µg/ml 0,982, 76, 98.4% e 96.7%.

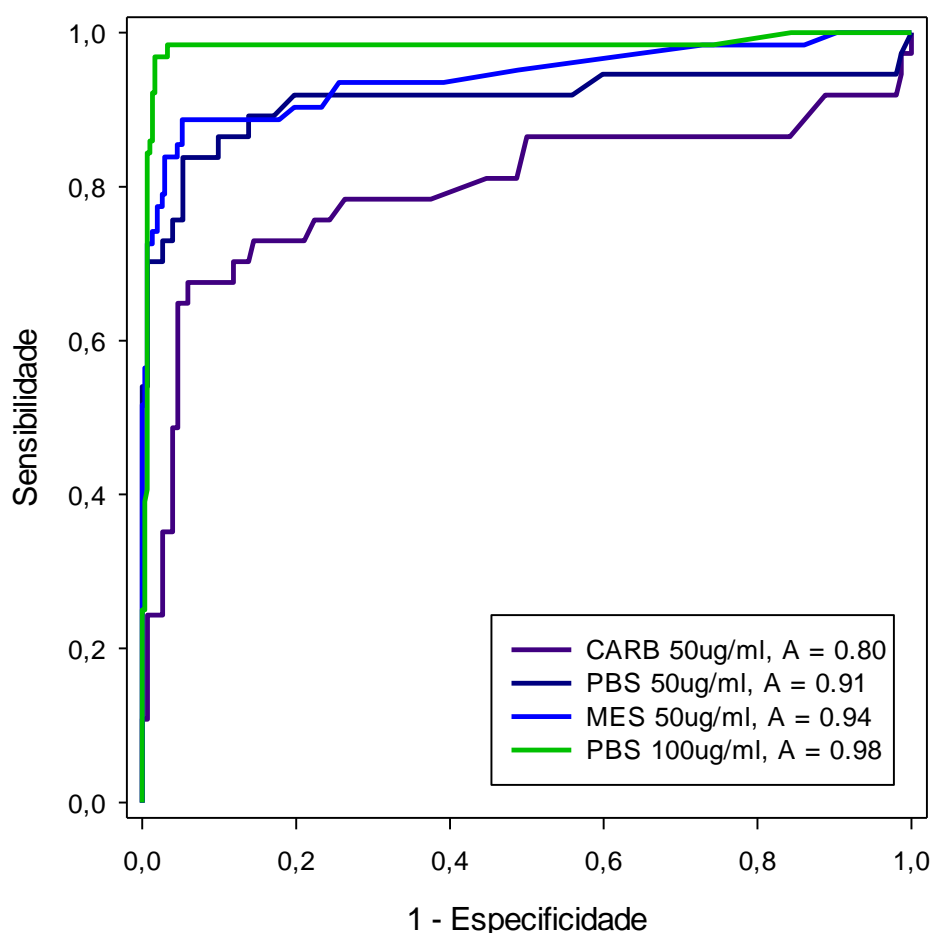


FIGURA 4.10- GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ACOPLAMENTOS DE HBV CORE; ((A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.

A partir da análise dos resultados consolidados na Tabela 4.17 as condições MES 50µg/ml e PBS 100µg/ml apresentaram os melhores resultados, pois

apresentaram os maiores valores de AUC, assim como, de sensibilidade/especificidade. Foi escolhido 100µg/ml em CARBO como a melhor condição de acoplamento para o multiteste por esta apresentar uma AUC de 0,982, cutoff 76, sensibilidade 98.4% e especificidade 96.7%. Quando comparamos as curvas ROC e suas AUC dos resultados obtidos no gráfico A na FIGURA 4.10 observa-se a diferença entre estas mostrando que realmente a condição escolhida tem um desempenho melhor que as outras.

TABELA 4.17 - ACOPLAMENTO HBV CORE FITZGETALD

ANTÍGENO	CORE	CORE	CORE	CORE
TAMPÃO	CARBO	PBS	MÊS	PBS
[ACOPLAMENTO]	50	50	50	100
CUTOFF	19	30	15	76
NEGATIVOS	152	152	307	306
NEGATIVOS VERDADEIROS	81	122	243	296
POSITIVOS	37	37	64	64
POSITIVOS VERDADEIROS	30	34	56	63
FALSO POSITIVOS	71	30	64	10
SENSIBILIDADE	81.1%	91.9%	87.5%	98.4%
ESPECIFICIDADE	53.3%	80.3%	79.2%	96.7%
TOTAL AMOSTRAS	189	189	371	370
ÁREA DA CURVA ROC	0.7973	0.9124	0.9419	0.982
DESVIO PADRÃO	0.0535	0.0393	0.0212	0.01264
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	0.6924 ATÉ 0.9022	0.8354 ATÉ 0.9895	0.9003 ATÉ 0.9834	0.9572 ATÉ 1.007
VALOR DE P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0003	< 0.0004

4.7.2 HBV Core 183

Os resultados obtidos das diferentes condições de acoplamento descritos na Figura 4.11 e na Tabela 4.18 obtiveram um valor de AUC, de cutoff, sensibilidade e especificidade: MES 50µg/ml 0.910, 19, 94.6% e 50.7%; CARBO 50 µg/ml 0,9060, 36, 97.3% e 19.7%; PBS 50 µg/ml 0.9043, 65, 97.3% e 36.8%.

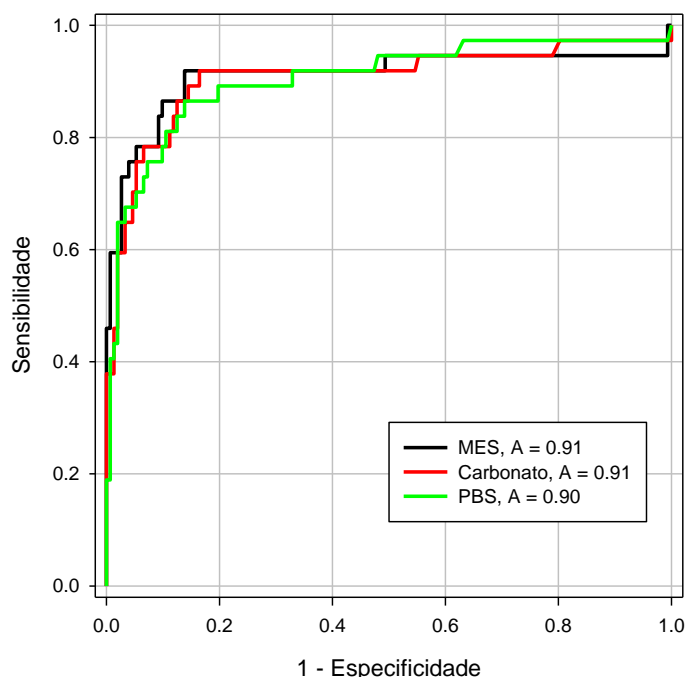


FIGURA 4.11 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HBV CORE 183, (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.

A partir da análise dos resultados consolidados na Tabela 4.18 a condição MES 50 µg/ml apresentaram os melhores resultados, pois apresentaram os maiores valores de AUC, assim como, de sensibilidade/especificidade. Foi escolhido o 50µg/ml em MES como a melhor condição de acoplamento para o multiteste por esta apresentar uma AUC de 0.910 , cutoff 19, sensibilidade 94.6% e especificidade 50.7%. Quando comparamos as curvas ROC e suas AUC dos resultados obtidos na gráfico A na (Figura 4.11) observa-se a diferença entre estas mostrando que realmente a condição escolhida tem um desempenho melhor que as outras.

TABELA 4.18 - ACOPLAMENTOS DOS ANTÍGENOS PARA HBV 183

DOENÇA	HBV	HBV	HBV
ANTÍGENO	1-183	1-183	1-183
TAMPÃO	MÊS	CARBONATO	PBS
[ACOPLAMENTO]	50	50	50
CUTOFF	19	36	65
NEGATIVOS	152	152	152

NEGATIVOS VERDADEIROS	77	30	56
POSITIVOS	37	37	37
POSITIVOS VERDADEIROS	35	36	36
FALSO POSITIVOS	75	122	96
SENSIBILIDADE	94.59%	97.3%	97.3%
ESPECIFICIDADE	50.66%	19.7%	36.8%
TOTAL AMOSTRAS	189	189	189
ÁREA DA CURVA ROC	0.9109	0.9060	0.9043
DESVIO PADRÃO	0.0387	0.0364	0.0343
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	0.8350 ATÉ 0.9868	0.8347 ATÉ 0.9774	0.8371 ATÉ 0.9716
VALOR DE P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

4.7.3 HBV Core 8914

Acoplamento HBV Core 8914 CARBO 25 µg/ml apresentou uma área sob a curva (Area Under Curve – AUC) de 0,9649 Figura 4.12 - A. A partir da análise da curva ROC (Receiver Operating Characteristic) foi possível determinar o valor de cutoff 96 para 97.3% de sensibilidade e maior especificidade possível 68.6%.

DOENÇA	HBV
ANTÍGENO	CORE 8914
TAMPÃO	CARBO
[ACOPLAMENTO]	25µG/ML
CUTOFF	96
NEGATIVOS	152
NEGATIVOS VERDADEIROS	115
POSITIVOS	37
POSITIVOS VERDADEIROS	36
FALSO POSITIVOS	37
SENSIBILIDADE	97.3%
ESPECIFICIDADE	68,6%
TOTAL AMOSTRAS	189
ÁREA DA CURVA ROC	0.9649
DESVIO PADRÃO	0.01367
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	0.9381 ATÉ 0.9917
VALOR DE P	< 0.0001

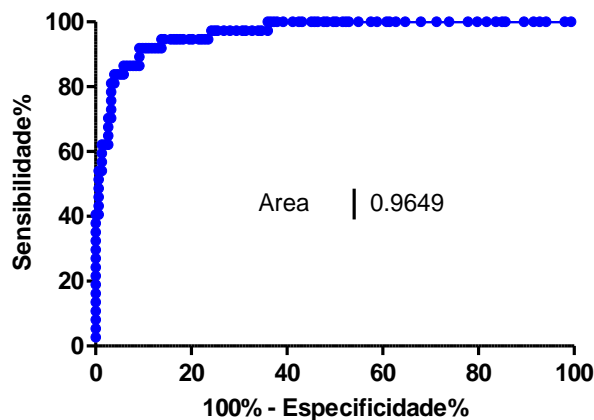


FIGURA 4.12 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HBV CORE 8914 CARBO 25 $\mu\text{G}/\text{ML}$; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC

4.7.4 HBV CORE 8927

Acoplamento HBV Core 8927 PBS 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ apresentou uma área sob a curva (Area Under Curve – AUC) de 0,9402 Figura 4.13 - A. A partir da análise da curva ROC (Receiver Operating Characteristic) foi possível determinar o valor de cutoff 80 para 97.3% de sensibilidade e maior especificidade possível 65.4%.

TABELA 4.19 - HBV CORE 8927

DOENÇA	HBV
ANTÍGENO	CORE 8927
TAMPÃO	PBS
[ACOPLAMENTO]	25 $\mu\text{G}/\text{ML}$
CUTOFF	80
NEGATIVOS	153
NEGATIVOS VERDADEIROS	100
POSITIVOS	37
POSITIVOS VERDADEIROS	36
FALSO POSITIVOS	53
SENSIBILIDADE	97.3%
ESPECIFICIDADE	65.4%

TOTAL AMOSTRAS	190
ÁREA DA CURVA ROC	0.931
DESVIO PADRÃO	0.02212
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	0.8876 ATÉ 0.9744
VALOR DE P	< 0.0001

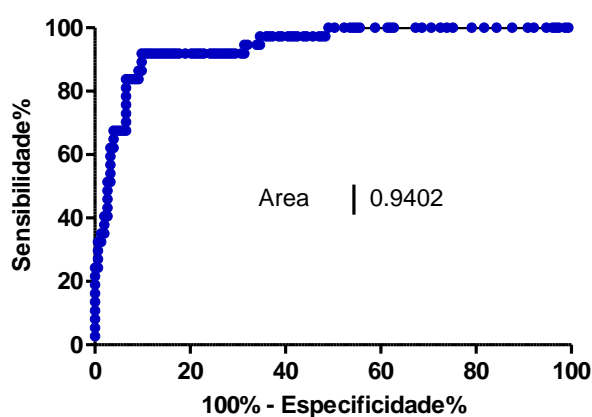


FIGURA 4.13 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HBV CORE 8927 PBS 25 μ G/ML; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC

4.7.5 HBV CORE 8929

As condições de acoplamento tiveram respectivamente os seguintes valores de AUC, de cutoff, sensibilidade e especificidade: MES 25 μ g/ml 0.9483, 63, 97.3% e 74.5%; CARBO 25 μ g/ml 0.9320, 242, 97.3% e 47.17%; PBS 25 μ g/ml 0.9042, 25, 97.3% e 27.5%.

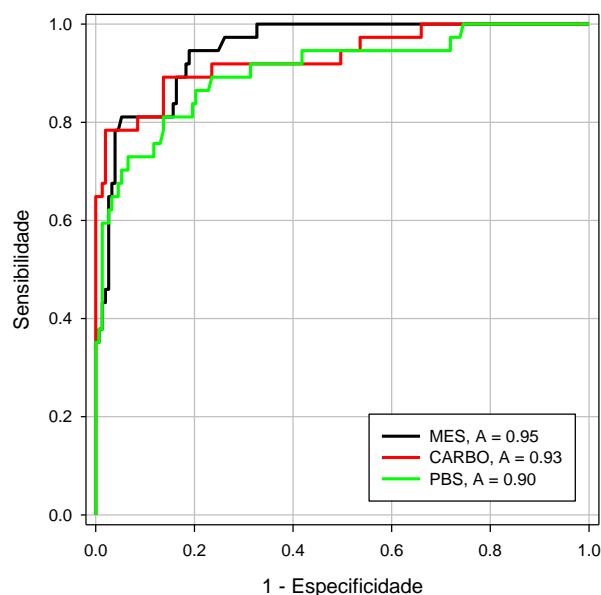


FIGURA 4.14 GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HBV CORE 8929, (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.

A partir da análise dos resultados consolidados na Tabela 4.20 a condição MES 25µg/ml apresentaram os melhores resultados, pois apresentaram os maiores valores de AUC, assim como, de sensibilidade/especificidade. Foi escolhido o 25 µg/ml em MES como a melhor condição de acoplamento para o multiteste por esta apresentar uma AUC de 0.9483 , cutoff 63, sensibilidade 97.3% e especificidade 74.5%. Quando comparamos as curvas ROC e suas AUC dos resultados obtidos na (Figura 4.14) observa-se a diferença entre estas mostrando que realmente a condição escolhida tem um desempenho melhor que as outras.

TABELA 4.20 - ACOPLAMENTO HBV CORE 8929

DOENÇA	HBV		
ANTÍGENO	CORE 8929	CORE 8929	CORE 8929
TAMPÃO	MES	CARBO	PBS
[ACOPLAMENTO]	25	25	25
CUTOFF	63	242	276
NEGATIVOS	153	153	153
NEGATIVOS	114	72	42

VERDADEIROS			
POSITIVOS	37	37	37
POSITIVOS VERDADEIROS	36	36	36
FALSO POSITIVOS	39	81	111
SENSIBILIDADE	97.3%	97.3%	97.3%
ESPECIFICIDADE	74.5%	47.1%	27.5%
TOTAL AMOSTRAS	190	190	190
ÁREA DA CURVA ROC	0.9483	0.9320	0.9042
DESVIO PADRÃO	0.0162	0.0267	0.0311
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	0.9165 ATÉ 0.9801	0.8796 ATÉ 0.9844	0.8432 ATÉ 0.9651
VALOR DE P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

4.7.6 HBV Core Delta

As condições de acoplamento consolidadas Tabela 4.21 tiveram respectivamente os seguintes valores de AUC, de cutoff, sensibilidade e especificidade: MES 50µg/ml 0.9665, 57, 97.3% e 74.5%; CARBO 50µg/ml 0.9805, 275, 97.3% e 87.5%; PBS 50µg/ml 0.9371, 111, 97.3% e 86.8%.

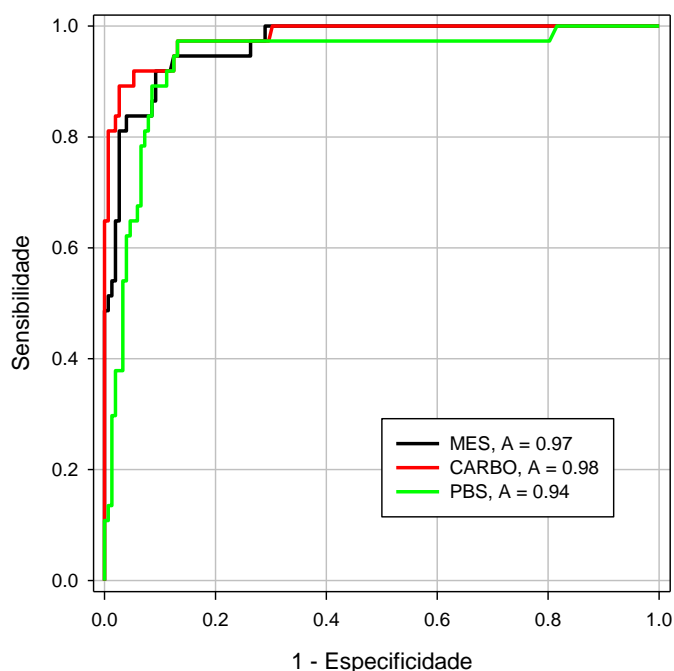


FIGURA 4.15 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HBV CORE DELTA; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO

ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.

A partir da análise dos resultados a condição MES 50µg/ml apresentou o melhores resultado, pois apresentou o maior valor de AUC, assim como, de sensibilidade/especificidade. Foi escolhido o 50µg/ml em CARBO como a melhor condição de acoplamento para o multitest e por esta apresentar uma AUC de 0.9805, cutoff 275, sensibilidade 97.3% e especificidade 87.5%. Quando comparamos as curvas ROC e suas AUC dos resultados obtidos na Figura 4.15 observa-se a diferença entre estas mostrando que realmente a condição escolhida tem um desempenho melhor que as outras.

TABELA 4.21 – ACOPLAMENTOS HBV CORE DELTA

DOENÇA	HBV		
ANTÍGENO	CORE DELTA	CORE DELTA	CORE DELTA
TAMPÃO	MES	CARBO	PBS
[ACOPLAMENTO]	50	50	50
CUTOFF	57	275	111
NEGATIVOS	152	152	152
NEGATIVOS VERDADEIROS	113	133	132
POSITIVOS	37	37	37
POSITIVOS VERDADEIROS	36	36	36
FALSO POSITIVOS	39	19	20
SENSIBILIDADE	97.3%	97.3%	97.3%
ESPECIFICIDADE	74.3%	87.5%	86.8%
TOTAL AMOSTRAS	189	189	189
ÁREA DA CURVA ROC	0.9665	0.9805	0.9371
DESVIO PADRÃO	0.0128	0.0099	0.0243
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	0.9414 ATÉ 0.9916	0.9611 ATÉ 1.000	0.8894 ATÉ 0.9847
VALOR DE P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

4.7.7 HBV CORE Meridian

As condições de acoplamento Tabela 4.22 tiveram respectivamente os melhores resultados um valor de AUC, de cutoff, sensibilidade e especificidade: MES

100 µg/ml 0.9978, 65, 97.3% e 74.5%; PBS 100 µg/ml 0.9805, 275, 97.3% e 87.5%;
 PBS 50 µg/ml 0.9371, 111, 97.3% e 86.8%.

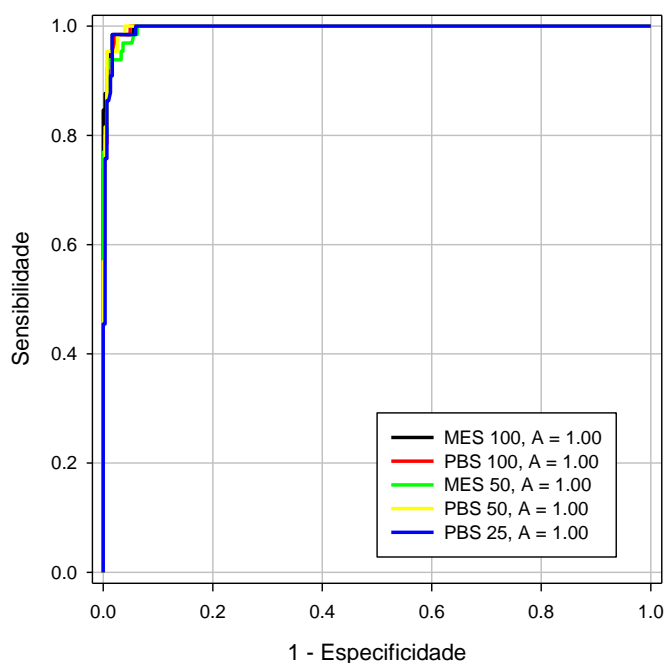


FIGURA 4.16 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HBV CORE DELTA; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.

A partir da análise dos resultados a condição MES 100µg/ml e PBS 50µg/ml apresentaram os melhores resultados, pois apresentaram os maiores valores de AUC, assim como, de sensibilidade/especificidade. Foi escolhido o 50µg/ml em PBS como a melhor condição de acoplamento para o multiteste por esta apresentar uma AUC de 0.9805, cutoff 275, sensibilidade 97.3% e especificidade 87.5%. Quando comparamos as curvas ROC e suas AUC dos resultados obtidos na Figura 4.16 observa-se a diferença entre estas mostrando que realmente a condição escolhida tem um desempenho melhor que as outras.

TABELA 4.22 - ACOPLAMENTOS HBV CORE MERIDIAN

DOENÇA	HBV				
ANTÍGENO	CORE MERIDIAN	CORE MERIDIAN	CORE MERIDIAN	CORE MERIDIAN	CORE MERIDIAN
TAMPÃO	MES	PBS	MES	PBS	PBS
[ACOPLAMENTO]	100µG/ML	100µG/ML	50µG/ML	50µG/ML	25µG/ML
CUTOFF	65	79	54	101	39
NEGATIVOS	298	300	303	300	294
NEGATIVOS VERDADEIROS	281	285	284	288	275
POSITIVOS	65	65	65	65	65
POSITIVOS VERDADEIROS	65	65	65	65	65
FALSO POSITIVOS	17	15	19	12	19
SENSIBILIDADE	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
ESPECIFICIDADE	94.3%	95.0%	93.7%	96.0%	93.5%
TOTAL AMOSTRAS	363	365	368	365	359
ÁREA DA CURVA ROC	0.9978	0.9971	0.9961	0.9969	0.9956
DESVIO PADRÃO	0.0013	0.0016	0.0019	0.0018	0.0023
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	0.9953 ATÉ 1.000	0.9940 ATÉ 1.000	0.9924 ATÉ 0.9998	0.9933 ATÉ 1.000	0.9910 ATÉ 1.000
VALOR DE P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

4.7.8 Comparação entre as melhores condições dos antígenos de HBV

A fim de determinar o melhor antígeno ou a combinação de antígenos para se obter o melhor teste os melhores resultados dos acoplamentos CORE Carbo, Core PBS, 1-183 PBS, Core 8914 Carbo, Core 8927 PBS 25 µg/ml, Core 8929 µg/ml, Core Delta Carbo, Core Meridian PBS 50 µg/ml tiveram seus melhores resultados comparados entre si.

TABELA 4.23 - MELHORES RESULTADOS DE CADA ANTÍGENO

ANTÍGENO	CORE	CORE	1-183	CORE 8914	CORE 8927	CORE 8929	CORE DELTA	CORE MERIDIAN
	TESTE 1	TESTE 2	TESTE 3	TESTE 4	TESTE 5	TESTE 6	TESTE 7	TESTE 8
TAMPÃO	CARBO	PBS	MÊS	CARBO	PBS	MES	CARBO	PBS
[ACOPLAMENTO]	50µG/ML	100 µG/ML	50 µG/ML	25 µG/ML	25µG/ML	25 µG/ML	50 µG/ML	50µG/ML
CUTOFF	443	76	65	96	80	63	275	101
NEGATIVOS	152	306	152	152	153	153	152	300
NEGATIVOS VERDADEIROS	115	296	56	115	100	114	133	288
POSITIVOS	37	64	37	37	37	37	37	65
POSITIVOS VERDADEIROS	35	63	36	36	36	36	36	65
FALSO POSITIVOS	37	10	96	37	53	39	19	12
TOTAL AMOSTRAS	189	370	189	189	190	190	189	365
SENSIBILIDADE	95%	98%	97%	97%	97%	97%	97%	100%
ESPECIFICIDADE	76%	97%	37%	76%	65%	75%	88%	96%
TAXA DE FALSO POSITIVOS	24%	3%	63%	24%	35%	25%	13%	4%
ACURÁCIA	79%	97%	49%	80%	72%	78,9%	89,4%	96,7%
PRECISÃO	49%	86%	27%	49%	40%	48,0%	65,5%	84,4%
VALOR PREDITIVO NEGATIVO	98%	100%	98%	99%	99%	99%	99%	100%
ÁREA DA CURVA ROC	0.9157	0.982	0.9043	0.9649	0.931	0.9483	0.9805	0.9969
DESVIO PADRÃO	0.0377	0.01264	0.0343	0.01367	0.02212	0.0162	0.0099	0.0018
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	0.8414 ATÉ 0.9896	0.9572 ATÉ 1.007	0.8371 ATÉ 0.9716	0.9381 ATÉ 0.9917	0.8876 ATÉ 0.9744	0.9165 ATÉ 0.9801	0.9611 ATÉ 1.000	0.9933 ATÉ 1.000
VALOR DE P	< 0.0001	< 0.0004	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

Quando o resultado dos valores das curvas ROC destes antígenos é comparado é possível notar que estas apresentaram diferenças de área, indicando a razão dos diferentes entre os resultados obtidos entre os antígenos Figura 4.17.

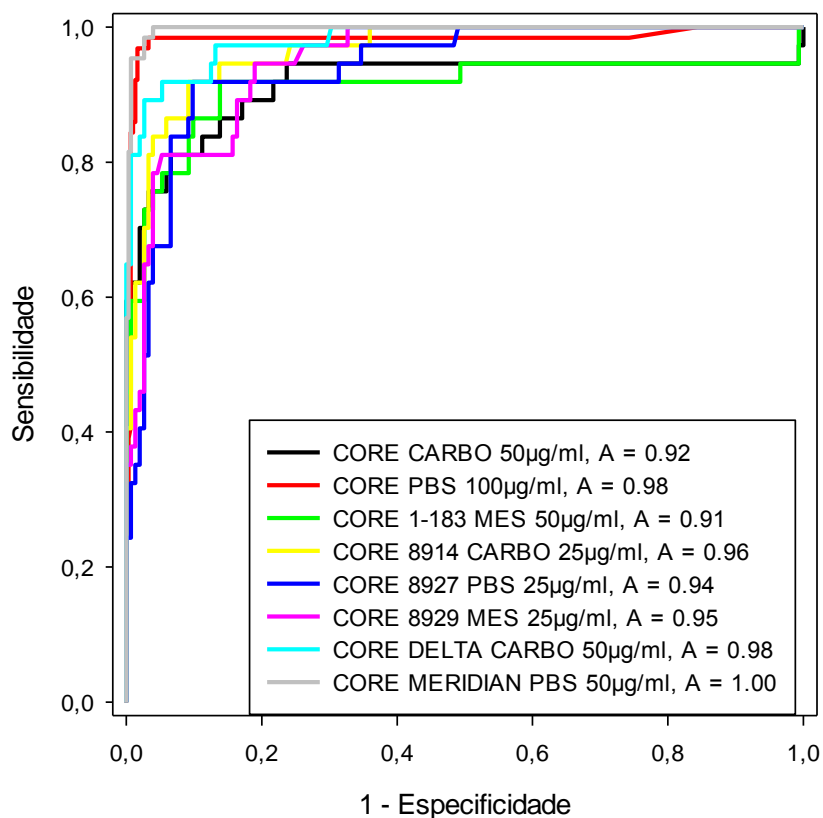


FIGURA 4.17 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DOS ANTÍGENO DE HBV CORE; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.

	CORE CARBO, CORE PBS	CORE CARBO, CORE 1- 183	CORE CARBO, CORE 8914	CORE CARBO, CORE 8927	CORE CARBO, CORE 8929	CORE CARBO, CORE DELTA	CORE CARBO, CORE MERIDIAN
DIFERENÇA DE ÁREA	-0,06626	0,004801	-0,04922	-0,02449	-0,03261	-0,06481	-0,08115
ERRO PADRÃO	0,03976	0,05403	0,0401	0,04258	0,04104	0,03898	0,03774
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	-0.1442 ATÉ 0.0116	-0.1011 ATÉ 0.1107	-0.1278 ATÉ 0.0293	-0.1080 ATÉ 0.0589	-0.1131 ATÉ 0.0478	-0.1412 ATÉ 0.0116	-0.1551 ATÉ -0.007
ESTATÍSTICA Z	-1,666	0,08885	-1,227	-0,575	-0,7946	-1,663	-2,15
VALOR DE P	0,09562	0,9292	0,2197	0,5653	0,4268	0,0964	0,03154

	CORE PBS, CORE 1- 183	CORE PBS, CORE 8914	CORE PBS, CORE 8927	CORE PBS, CORE 8929	CORE PBS, CORE DELTA	CORE PBS, CORE MERIDIAN	CORE 1-183, CORE 8914
DIFERENÇA DE ÁREA	0,07107	0,01705	0,04178	0,03365	0,001453	-0,01489	-0,05402
ERRO PADRÃO	0,04072	0,01862	0,02349	0,02057	0,01607	0,01277	0,04105
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	-0.008751 ATÉ 0.15	-0.01944 ATÉ 0.053	-0.004271 ATÉ 0.08	-0.006656 ATÉ 0.07	-0.03005 ATÉ 0.032	-0.03992 ATÉ 0.010	-0.1345 ATÉ 0.0264
ESTATÍSTICA Z	1,745	0,9157	1,778	1,636	0,09041	-1,166	-1,316
VALOR DE P	0,08096	0,3598	0,07537	0,1018	0,928	0,2437	0,1882

	CORE 1- 183, CORE 8927	CORE 1- 183, CORE 8929	CORE 1- 183, CORE DELTA	CORE 1- 183, CORE MERIDIAN	CORE 8914, CORE 8927	CORE 8914, CORE 8929	CORE 8914, CORE DELTA
DIFERENÇA DE ÁREA	-0,02929	-0,03741	-0,06961	-0,08596	0,02473	0,0166	-0,01559
ERRO PADRÃO	0,04348	0,04197	0,03996	0,03875	0,02406	0,02121	0,01689
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	-0.1145 ATÉ 0.0559	-0.1197 ATÉ 0.0448	-0.1479 ATÉ 0.0087	-0.1619 ATÉ - 0.010	-0.02243 ATÉ 0.071	-0.02496 ATÉ 0.058	-0.04869 ATÉ 0.017
ESTATÍSTICA Z	-0,6736	-0,8914	-1,742	-2,218	1,028	0,7829	-0,9234
VALOR DE P	0,5006	0,3727	0,08151	0,02655	0,304	0,4337	0,3558

	CORE 8914, CORE MERIDIAN	CORE 8927, CORE 8929	CORE 8927, CORE DELTA	CORE 8927, CORE MERIDIAN	CORE 8929, CORE DELTA	CORE 8929, CORE MERIDIAN	CORE DELTA, CORE MERIDIAN
DIFERENÇA DE ÁREA	-0,03194	-0,008126	-0,04032	-0,05667	-0,0322	-0,04854	-0,01634
ERRO PADRÃO	0,01378	0,0256	0,02215	0,01988	0,01901	0,01632	0,01009
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	-0.05895 ATÉ -0.00	-0.05829 ATÉ 0.042	-0.08374 ATÉ 0.003	-0.09564 ATÉ -0.01	-0.06946 ATÉ 0.005	-0.08053 ATÉ -0.01	-0.03611 ATÉ 0.003
ESTATÍSTICA Z	-2,317	-0,3175	-1,821	-2,85	-1,694	-2,974	-1,62
VALOR DE P	0,02051	0,7509	0,06866	0,004374	0,09036	0,002935	0,1051

Os antígenos Core Meridian, Core Delta e Core apresentaram os melhores valores de AUC, respectivamente, 0.9969, 0.9805 e 0.9802. Quando combinados com o objetivo de verificar se há uma melhoria no teste a combinação destes aumentou a sensibilidade e especificidade quando combinados os antígenos CORE quando combinado com os antígenos CORE DELTA e CORE MERIDIAN melhora sua performance, a combinação core delta e core meridian piora a performance do antígeno Core meridian diminuem em especial sua a especificidade do teste.

Porém, do ponto de vista funcional do teste os dois antígenos funcionam como backup um do outro e seria interessante se melhorassem a acurácia e precisão do ensaio, permitindo ter uma maior confiança dos resultados obtidos. Porém, a combinação dos antígenos HBV core Delta e HBV core Meridian pioram a performance do teste, diminuindo a precisão e acurácia dos testes individuais para 91% de acurácia e 67% de precisão. A combinação de HBV CORE com o HBV Core Meridian melhora a sua performance dos testes combinados para 93% de acurácia e 74% de precisão mas ainda abaixo da performance individual do HBV core Meridian.

TABELA 4.24- ANÁLISE DE COMBINAÇÃO ANTÍGENO + ANTÍGENO

	CORE CARBO, CORE PBS	CORE CARBO, CORE 1- 183	CORE CARBO, CORE 8914	CORE CARBO, CORE 8927	CORE CARBO, CORE 8929	CORE CARBO, CORE DELTA	CORE CARBO, CORE MERIDIAN	CORE PBS, CORE 1-183	CORE PBS, CORE 8914	CORE PBS, CORE 8927	CORE PBS, CORE 8929
POS VER	62	35	35	35	35	35	63	62	62	62	62
NEG VER	258	56	115	100	115	115	251	200	259	243	258
POS FAL	47	96	37	53	38	37	49	106	47	63	48
NEG FAL	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	370	189	189	190	190	189	365	370	370	370	370
SENSIBILIDADE	95%	95%	95%	95%	95%	95%	97%	97%	97%	97%	97%
ESPECIFICIDADE	84,6%	36,8%	75,7%	65,4%	75,2%	75,7%	83,7%	65,4%	84,6%	79,4%	84,3%
TAXA DE FALSOS POSITIVOS	15,41%	63,16%	24,34%	34,64%	24,84%	24,34%	16,33%	34,64%	15,36%	20,59%	15,69%
ACURÁCIA	86%	48%	79%	71%	79%	79%	86%	71%	87%	82%	86%
PRECISÃO	57%	27%	49%	40%	48%	49%	56%	37%	57%	50%	56%
VALOR PREDITIVO NEGATIVO	43%	73%	51%	60%	52%	51%	44%	63%	43%	50%	44%

	CORE PBS, CORE DELTA	CORE PBS, CORE MERIDIAN	CORE 1-183, CORE 8914	CORE 1-183, CORE 8927	CORE 1-183, CORE 8929	CORE 1- 183, CORE DELTA	CORE 1- 183, CORE MERIDIAN	CORE 8914, CORE 8927	CORE 8914, CORE 8929	CORE 8914, CORE DELTA	CORE 8914, CORE MERIDIAN
POS VER	62	64	35	35	35	35	64	35	35	35	64
NEG VER	267	277	19	3	17	37	192	3	17	37	192
POS FAL	39	22	133	149	135	115	108	149	135	115	108
NEG FAL	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1
	370	365	189	189	189	189	365	189	189	189	365
SENSIBILIDADE	97%	97%	95%	95%	95%	95%	98%	95%	95%	95%	98%

ESPECIFICIDADE	87,3%	92,6%	12,5%	2,0%	11,2%	24,3%	64,0%	2,0%	11,2%	24,3%	64,0%
TAXA DE FALSOS POSITIVOS	12,75%	7,36%	87,50%	98,03%	88,82%	75,66%	36,00%	98,03%	88,82%	75,66%	36,00%
ACURÁCIA	89%	93%	29%	20%	28%	38%	70%	20%	28%	38%	70%
PRECISÃO	61%	74%	21%	19%	21%	23%	37%	19%	21%	23%	37%
VALOR PREDITIVO NEGATIVO	39%	26%	79%	81%	79%	77%	63%	81%	79%	77%	63%

	CORE 8927, CORE 8929	CORE 8927, CORE DELTA	CORE 8927, CORE MERIDIAN	CORE 8929, CORE DELTA	CORE 8929, CORE MERIDIAN	CORE DELTA, CORE MERIDIAN
POS VER	35	35	64	35	64	64
NEG VER	76	96	251	94	249	269
POS FAL	76	56	49	58	51	31
NEG FAL	2	2	1	2	1	1
	189	189	365	189	365	365
SENSIBILIDADE	95%	95%	98%	95%	98%	98%
ESPECIFICIDADE	50,0%	63,2%	83,7%	61,8%	83,0%	89,7%
TAXA DE FALSOS POSITIVOS	50,00%	36,84%	16,33%	38,16%	17,00%	10,33%
ACURÁCIA	59%	69%	86%	68%	86%	91%
PRECISÃO	32%	38%	57%	38%	56%	67%
VALOR PREDITIVO NEGATIVO	68%	62%	43%	62%	44%	33%

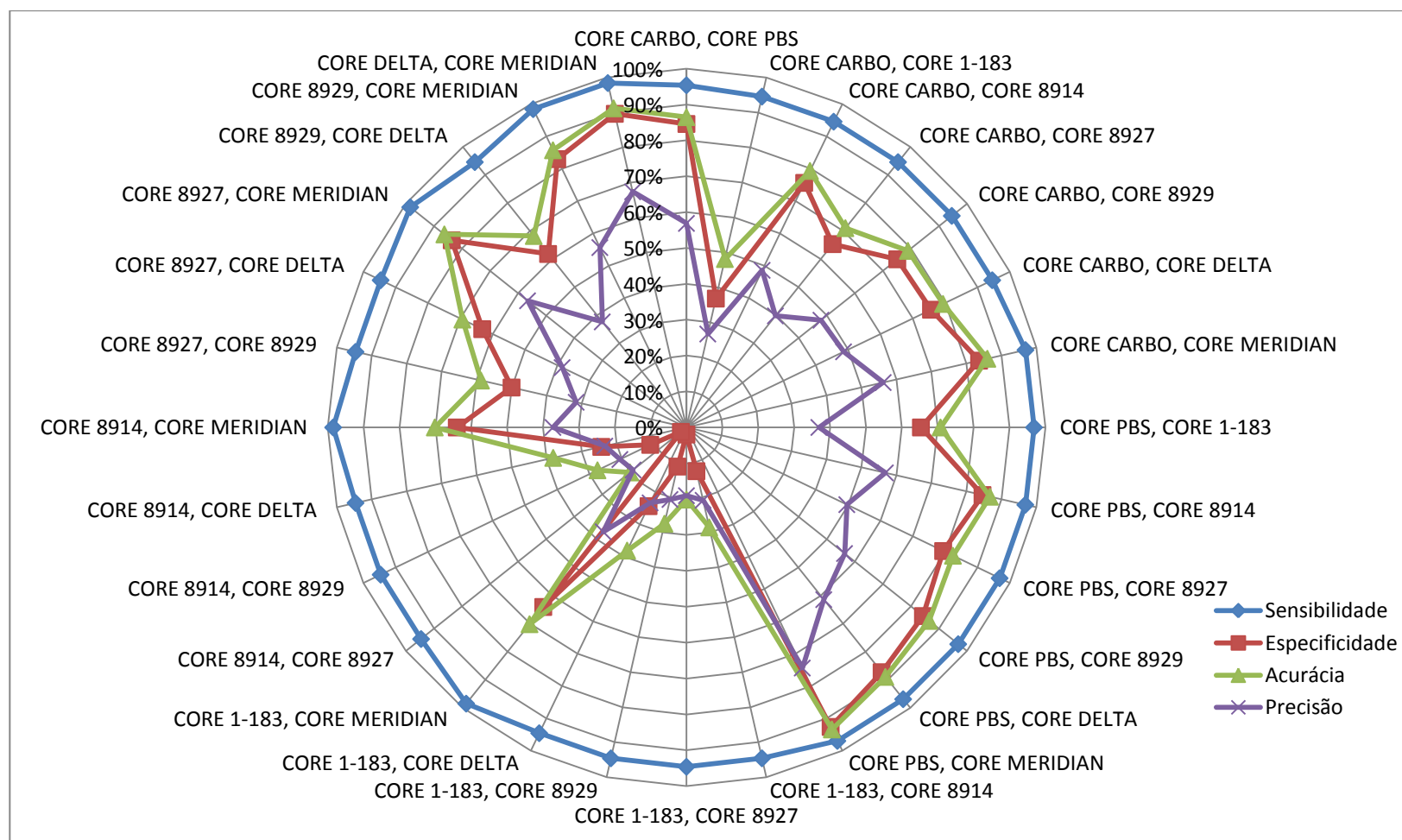


FIGURA 4.18 – ANÁLISE DE COMBINAÇÃO ANTÍGENO + ANTÍGENO DE HBV CORE GRÁFICO DAS PARÂMETROS OBTIDOS DA ANÁLISE DE CONTINGÊNCIA COM OS PARÂMETROS UTILIZADOS PARA AVALIAR A COMBINAÇÃO DOS ANTÍGENOS

4.8 ACOPLAMENTOS DOS ANTÍGENOS PARA HCV

4.8.1 HCV Multiantígeno

Acoplamento 201006037 HCV Multiantígeno Carbo 20µg/ml apresentou uma área sob a curva (Area Under Curve – AUC) de 1,000 Figura 4.19. A partir da análise da curva ROC (Receiver Operating Characteristic) foi possível determinar o valor de *cutoff* 80 para 100% de sensibilidade e maior especificidade possível 100%

TABELA 4.25 ANÁLISE ROC HCV MAG

DOENÇA	HCV
ANTÍGENO	MAG
TAMPÃO	CARBO
[ACOPLAMENTO]	20µG/ML
CUTOFF	80
NEGATIVOS	166
NEGATIVOS VERDADEIROS	166
POSITIVOS	23
POSITIVOS VERDADEIROS	23
FALSO POSITIVOS	0
SENSIBILIDADE	100.0%
ESPECIFICIDADE	100.0%
TOTAL AMOSTRAS	189
ÁREA EMBAIXO DA CURVA ROC	1.000
DESVIO PADRÃO	0.000
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	0.1000 ATÉ 0.1000
VALOR DE P	< 0.0001

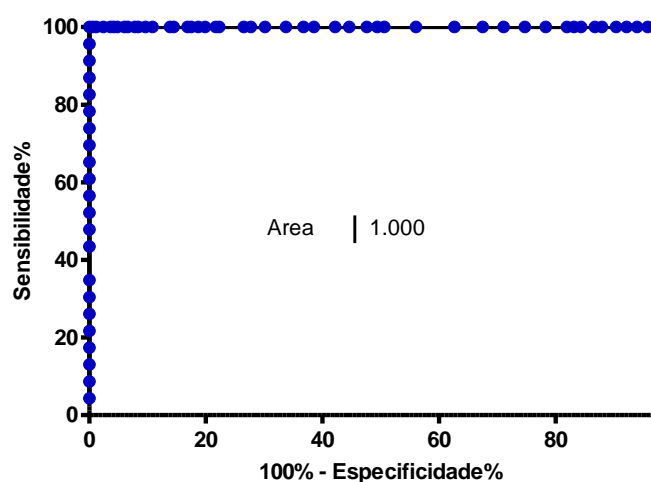


FIGURA 4.19 - GRÁFICO DA CURVA ROC CONDIÇÃO DE ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HCV MULTIANTÍGENO; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.

4.8.2 HCV Meridian

As condições de acoplamento tiveram respectivamente os seguintes valores de AUC, de *cutoff*, sensibilidade e especificidade: MES 100 µg/ml 0,9994, 80, 100% e 99.13%; CARBO 125µg/ml 1,000, 113, 100% e 100%; CARBO 100 µg/ml 1,000, 78, 100% e 100%; PBS 100 µg/ml 0,9996, 89, 100% e 99.7%.

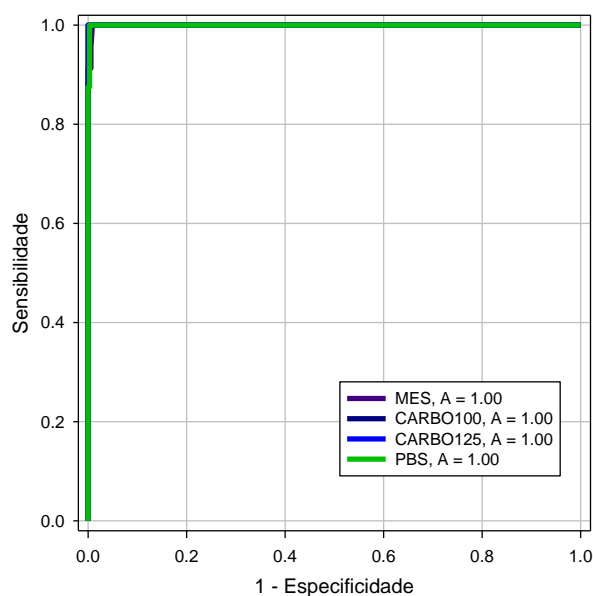


FIGURA 4.20 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HCV MERIDIAN; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.

A partir da análise dos resultados Tabela 4.26 as condições CARBO 100 µg/ml e CARBO 125µg/ml apresentaram os melhores resultados, pois apresentaram os maiores valores de AUC, assim como, de sensibilidade/especificidade. Foi escolhido o 100µg/ml em CARBO como a melhor condição de acoplamento para o multiteste por esta apresentar uma AUC de 1,000, cutoff 78, sensibilidade 100% e especificidade 100%. Quando comparamos as curvas ROC e suas AUC dos resultados obtidos na Figura 4.20 observa-se a diferença entre estas mostrando que realmente a condição escolhida tem um desempenho melhor que as outras.

TABELA 4.26 ACOPLAMENTOS HCV CORE MERIDIAN

DOENÇA	HCV			
ANTÍGENO	CORE MERIDIAN	CORE MERIDIAN	CORE MERIDIAN	CORE MERIDIAN
TAMPÃO	MES	CARBO	CARBO	PBS
[ACOPLAMENTO]	100µG/ML	125µG/ML	100µG/ML	100µG/ML
CUTOFF	80	113	78	89
NEGATIVOS	343	336	337	342
NEGATIVOS VERDADEIROS	340	336	337	341
POSITIVOS	22	23	23	23

POSITIVOS VERDADEIROS	22	23	23	23
FALSO POSITIVOS	3	0	0	1
SENSIBILIDADE	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
ESPECIFICIDADE	99.13%	100.0%	100.0%	99.7%
TOTAL AMOSTRAS	365	359	360	365
ÁREA DA CURVA ROC	0.9994	1.0000	1.0000	0.9996
DESVIO PADRÃO	0.0006	0.0000	0.0000	0.0005
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	0.9983 ATÉ 1.001	1.000 ATÉ 1.000	1.000 ATÉ 1.000	0.9988 ATÉ 1.001
VALOR DE P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

4.8.3 HCV NS3

Acoplamento HCV NS3 250µg/ml apresentou uma área sob a curva (Area Under Curve – AUC) de 0,9339 Figura 4.21. A partir da análise da curva ROC (Receiver Operating Characteristic) foi possível determinar o valor de *cutoff* 54 para 95,7% de sensibilidade e maior especificidade possível 74,7% Tabela 4.27.

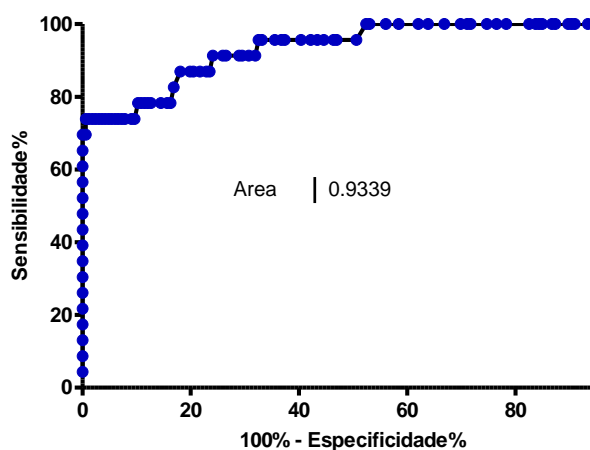


FIGURA 4.21 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HCV NS3; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.

TABELA 4.27 – RESULTADO ACOPLAMENTO NS3

DOENÇA	HCV
--------	-----

ANTÍGENO	NS3
TAMPÃO	CARBO
[ACOPLAMENTO]	250µG/ML
CUTOFF	54
NEGATIVOS	166
NEGATIVOS VERDADEIROS	124
POSITIVOS	23
POSITIVOS VERDADEIROS	22
FALSO POSITIVOS	42
SENSIBILIDADE	95.7%
ESPECIFICIDADE	74.7%
TOTAL AMOSTRAS	189
ÁREA DA CURVA ROC	0.9339
DESVIO PADRÃO	0.0283
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	0.8784 ATÉ 0.9893
VALOR DE P	< 0.0001

4.8.4 Comparação entre as melhores condições dos antígenos de HCV

A partir da análise dos resultados (Tabela 4.25) as condições HCV Multiantígeno CARBO 20 µg/ml e HCV Meridian CARBO125 µg/ml apresentaram os melhores resultados, pois apresentaram maiores valores de AUC, assim como, de sensibilidade/especificidade. Foi escolhido o HCV Multiantígeno 20µg/ml em CARBO como a melhor condição de acoplamento para o multitest e por esta apresentar uma AUC de 1,000, cutoff 80, sensibilidade 100% e especificidade 100%. Quando comparamos as curvas ROC e suas AUC dos resultados obtidos na Figura 4.22 observa-se a diferença entre estas mostrando que realmente a condição escolhida tem um desempenho melhor que as outras. Além disso, quando comparamos os MIF obtidos entre os diferentes resultados mostrados na Figura 4.22 observa-se que esta condição apresenta valores de MIF das amostras positivas permitindo uma separação maior entre as populações das amostras positivas e negativas, e mostrando que está de determinar diferentes intensidades de resposta devido à dispersão dos valores de MFI obtidos.

TABELA 4.28 - -ANÁLISE ROC DOS MELHORES ANTÍGENOS PARA CONFIRMAR DOENÇA DE CHAGAS

DOENÇA	HCV		
TESTE	1	2	3
ANTÍGENO	MAG	CORE MERIDIAN	NS3
TAMPÃO	CARBO	CARBO	CARBO
[ACOPLAMENTO]	20µG/ML	125µG/M	250µG/M
CUTOFF	80	113	54
NEGATIVOS	166	336	166
NEGATIVOS VERDADEIROS	166	336	124
POSITIVOS	23	23	23
POSITIVOS VERDADEIROS	23	23	22
FALSO POSITIVOS	0	0	42
TOTAL AMOSTRAS	189	359	189
SENSIBILIDADE	100.00%	100.00%	95.70%
ESPECIFICIDADE	100.00%	100.00%	74.70%
TAXA DE FALSO POSITIVOS	0%	0%	25%
ACURÁCIA	100%	100%	77%
PRECISÃO	100%	100%	34%
VALOR PREDITIVO NEGATIVO	100%	100%	99%
ÁREA DA CURVA ROC	1.0000	1.0000	0.9339
DESVIO PADRÃO	0.0000	0.0000	0.0283
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	0.1000 ATÉ 0.1000	1.000 ATÉ 1.000	0.8784 ATÉ 0.9893
VALOR DE P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

A fim de determinar o melhor antígeno ou a combinação de antígenos para o se obter o melhor teste os melhores resultados dos HCV Multiantígeno CARBO 20 µg/ml, HCV CORE CARBO 125 µg/ml e HCV NS3 CARBO 250 µg/ml tiveram seus resultados comparados entre si.

A comparação entre os resultados das curvas ROC do CORE X NS3, MULTIANTÍGENO x X NS3 apresentaram uma diferença de área de resultados pequena, mostrando a semelhança entre os resultados obtidos entre os antígenos.

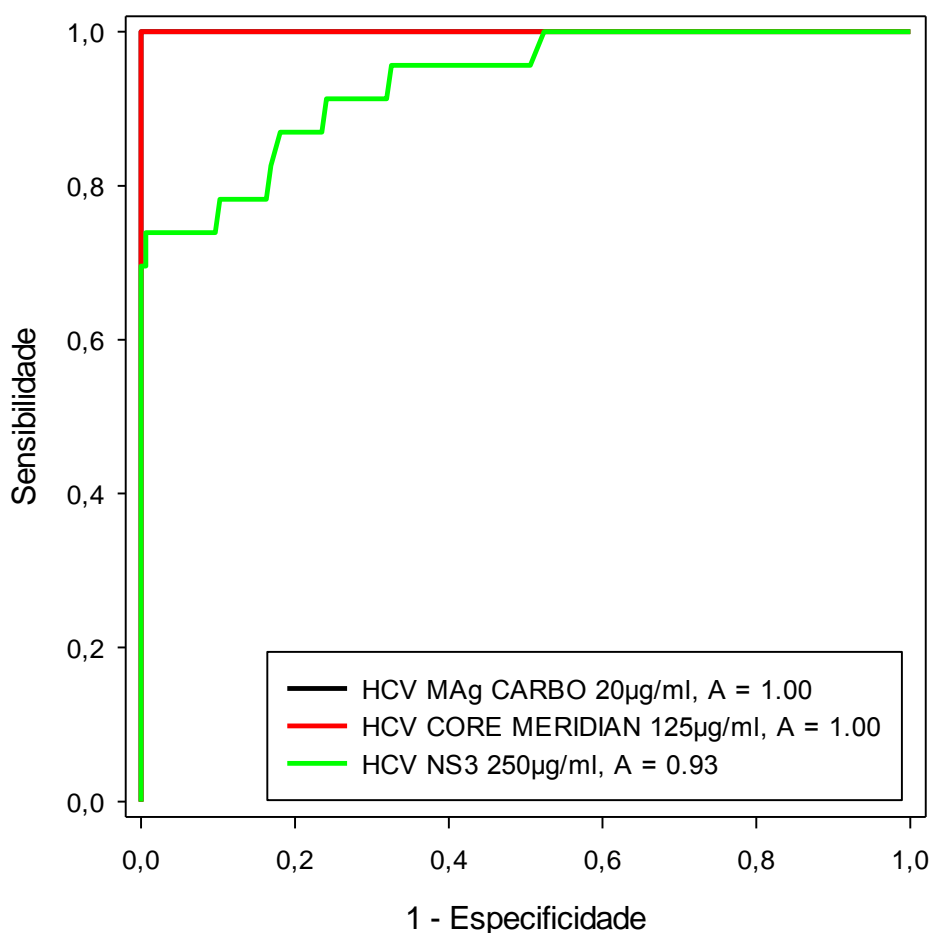


FIGURA 4.22 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DOS ANTÍGENOS DE HCV; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.

A comparação das curvas ROC dos antígenos MULTIANTÍGENO x CORE não apresentou valores de diferença de área, devido as curvas semelhantes, assim não há uma diferença na utilização de um ou outro antígeno no ensaio. Salvo pelo fato do multiantígeno ter em sua sequência epitópos proteína core, ns3, ns4 e ns5.

TABELA 4.29 - COMPARAÇÃO CURVAS ROC

COMPARAÇÃO CURVAS ROC

HCV MAG, CORE MERIDIAN	HCV MAG, HCV NS3	CORE MERIDIAN, HCV NS3
---------------------------	---------------------	---------------------------

DIFERENÇA DE ÁREA	0	6.6134	6.6134
ERRO PADRÃO	IDENTICAL DATA	2.8301	2.8301
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%		0.01066 ATÉ 0.1216	0.01066 ATÉ 0.1216
ESTATÍSTICA Z		2.3368	2.3368
VALOR DE P		1.9449	1.9449

Do ponto de vista biológico ou funcional do teste os dois antígenos funcionam como backup um do outro e melhoram a acurácia e precisão do ensaio, permitindo ter uma maior confiança dos resultados obtidos. Essa afirmação fica clara quando realizada uma análise de Combinação Antígeno + Antígeno TABELA 4.30 onde os resultados de sensibilidade/especificidade e acurácia/precisão são respectivamente para MULTIANTÍGENO X CORE 100%/100%, 100%/100%; MULTIANTÍGENO x NS3 96%/75% e 88% e 34%; CORE x NS3 96%/88% e 88%/34% GRAFICO. A combinação de Core Mreidian com o Multiantígeno não trás perda ao teste, de modo que foi definido que serão utilizados os antígenos HCV Multiantígeno 20 µg/ml para o multitteste.

ANÁLISE DE COMBINAÇÃO ANTÍGENO + ANTÍGENO TABELA 4.30

	HCV MAG, CORE MERIDIAN	HCV MAG, HCV NS3	CORE MERIDIAN, HCV NS3
POS VER	23	22	22
NEG VER	336	124	294
POS FAL	0	42	42
NEG FAL	0	1	1
	359	189	359
SENSIBILIDADE	100%	96%	96%
ESPECIFICIDADE	100.0%	74.7%	87.5%
TAXA DE FALSOS POSITIVOS	0.00%	25.30%	12.50%
ACURÁCIA	100%	77%	88%
PRECISÃO	100%	34%	34%
VALOR PREDITIVO NEGATIVO	0%	66%	66%

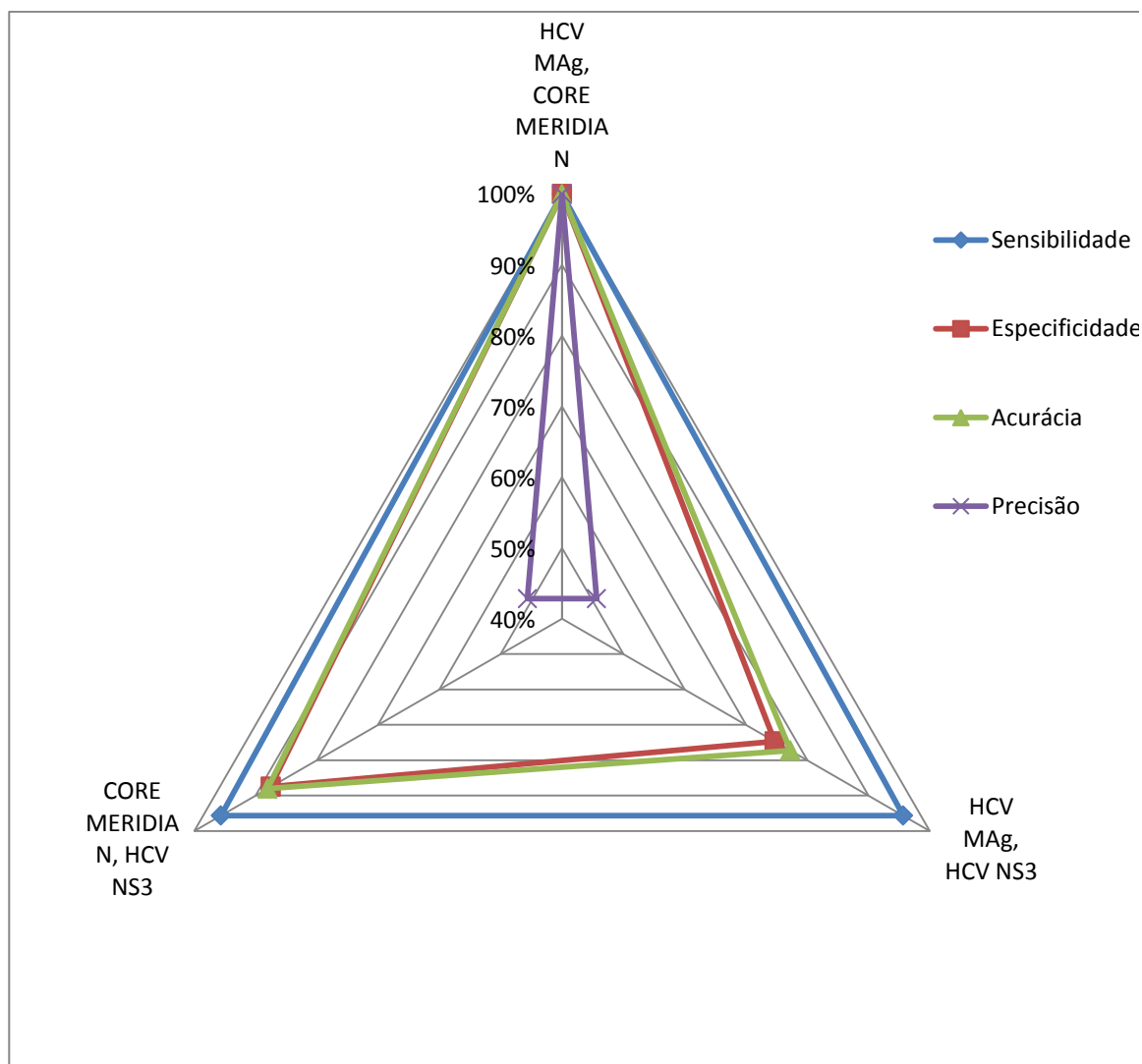


FIGURA 4.23 ANÁLISE DE COMBINAÇÃO ANTÍGENO + ANTÍGENO DE (A) CORRESPONDE A ÁREA ABAIXO DA CURVA CALCULADA PELA ANÁLISE CURVA ROC

4.9 ACOPLAMENTOS DOS ANTÍGENOS PARA HIV

4.9.1 Antígeno HIV-1 gag p17-p24, gp41-gp120

As condições de acoplamento tiveram respectivamente os seguintes valores de AUC, de *cutoff*, sensibilidade e especificidade: PBS 50 µg/ml 0,9947, 248, 100% e 93.2%; CARBO 50 µg/ml 0,8946, 65, 96.4% e 45,3%; e MES 50 µg/ml 0,9348, 154, 96.4% e 68,9%.

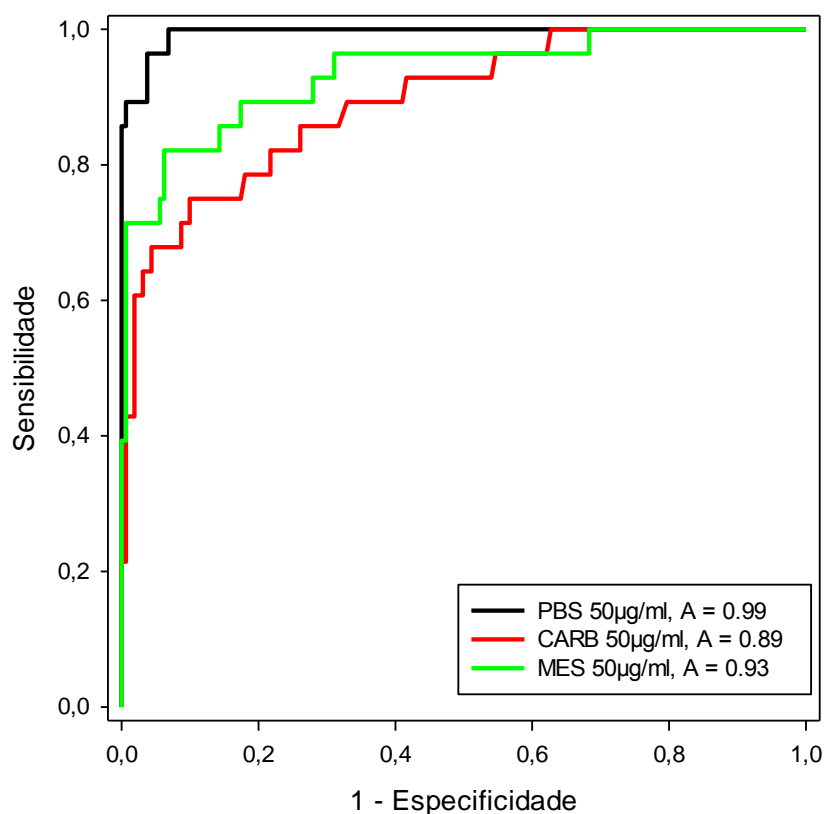


FIGURA 4.24 - GRÁFICO DA CURVA ROC HIV P17-24,GP41-120 DAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS; (A) CORRESPONDE A ÁREA ABAIXO DA CURVA CALCULADA PELA ANÁLISE CURVA ROC

A partir da análise dos resultados Tabela 4.31 as condições PBS 50 µg/ml e MES 50 µg/ml apresentaram os melhores resultados apresentando os maiores valores de AUC, assim como, de sensibilidade/especificidade. Foi escolhido o 50ug/ml em PBS como a melhor condição de acoplamento para o multiteste por esta apresentar uma AUC de 0,9947, cutoff 248, sensibilidade 100% e especificidade 93,2%. Quando comparamos as curvas ROC e suas AUC dos resultados obtidos na Figura 4.24 observa-se a diferença entre estas mostrando que realmente a condição escolhida tem um desempenho melhor que as outras.

TABELA 4.31 - ACOPLAMENTOS HIV GAG P17-24, GP41-120

DOENÇA	HIV	HIV	HIV
ANTÍGENO	HIV GAG P17-24, GP41-120	HIV GAG P17-24, GP41-120	HIV GAG P17-24, GP41-120
TAMPÃO	PBS	CARBO	MÊS

[ACOPLAMENTO]	50	50	50
CUTOFF	248	65	154
NEGATIVOS	161	161	161
NEGATIVOS VERDADEIROS	150	155	155
POSITIVOS	28	28	28
POSITIVOS VERDADEIROS	28	13	19
FALSO POSITIVOS	11	6	6
SENSIBILIDADE	100.0%	96.4%	96.4%
ESPECIFICIDADE	93.2%	45.3%	68.9%
TOTAL AMOSTRAS	362	189	189
ÁREA DA CURVA ROC	0,9947	0,8946	0,9348
DESVIO PADRÃO	3.552	3.405	2.827
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	0.9877 ATÉ 1.0	0.8279 ATÉ 0.9	0.8794 ATÉ 0.9
VALOR DE P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

4.9.2 HIV1 env conj gp 39 HIV2

As condições de acoplamento tiveram respectivamente os seguintes valores de AUC, de *cutoff*, sensibilidade e especificidade: CARBO 25 µg/ml 0.9445, 35, 100% e 57.3%; CARBO 75 µg/ml 0.8339, 102, 100% e 30.6%; PBS 25 µg/ml 0,9796, 270, 96.4% e 97,5%; MÊS 25 µg/ml 0.9647, 381, 96.4% e 94.4%; CARBO 50 µg/ml 0.9798, 522, 100% e 91.3%; e CARBO 100µg/ml 0.70667, 167, 96.4% e 44.1%.

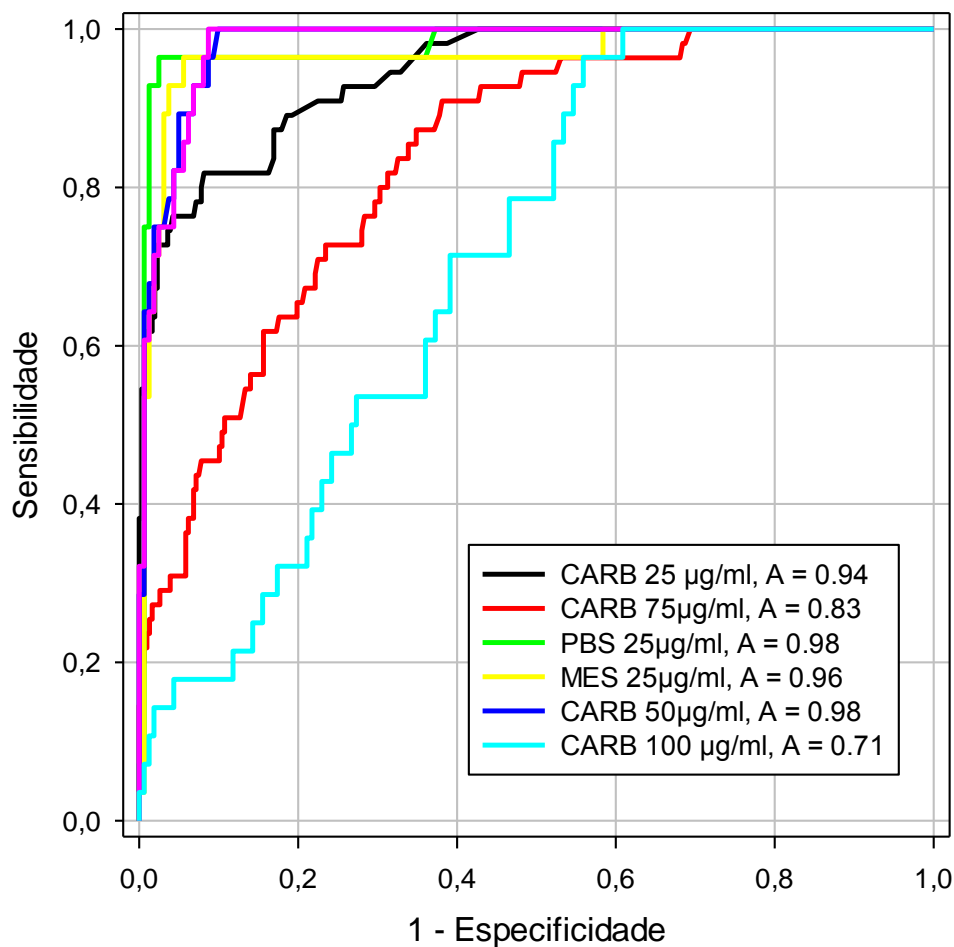


FIGURA 4.25 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HIV P17-24, GP41-120 DAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.

A partir da análise dos resultados Tabela 4.32 as condições PBS 50 µg/ml e CARBO 50 µg/ml apresentaram os melhores resultados, pois apresentaram os maiores valores de AUC, assim como, de sensibilidade/especificidade. Foi escolhido o 50µg/ml em CARBO como a melhor condição de acoplamento para o multiteste por esta apresentar uma AUC de 0,9796, cutoff 270, sensibilidade 96,4% e especificidade 97,5%. Quando comparamos as curvas ROC e suas AUC dos resultados obtidos na Figura 4.25 observa-se a diferença entre estas mostrando que realmente a condição escolhida tem um desempenho melhor que as outras.

TABELA 4.32 – ACOPLAMENTOS HIV1 ENV CONJ GP 39 HIV2

DOENÇA	HIV	HIV	HIV	HIV	HIV	HIV
ANTÍGENO	HIV1 ENV CONJ GP 39 HIV2	HIV1 ENV CONJ GP 39 HIV2	HIV1 ENV CONJ GP 39 HIV2	HIV1 ENV CONJ GP 39 HIV2	HIV1 ENV CONJ GP 39 HIV2	HIV1 ENV CONJ GP 39 HIV2
TAMPÃO	CARBO	CARBO	PBS	MES	CARBO	CARBOA
[ACOPLAMENTO]	25	75	25	25	50	100
CUTOFF	35	102	270	381	522	167
NEGATIVOS	307	307	161	161	161	161
NEGATIVOS VERDADEIROS	176	94	157	152	147	71
POSITIVOS	55	55	28	28	28	28
POSITIVOS VERDADEIROS	55	55	27	27	28	27
FALSO POSITIVOS	131	213	4	9	14	90
SENSIBILIDADE	100.0%	100.0%	96.4%	96.4%	100.0%	96.4%
ESPECIFICIDADE	57.3%	30.6%	97.5%	94.4%	91.3%	44.1%
TOTAL AMOSTRAS	362	362	189	189	189	189
ÁREA DA CURVA ROC	0.9445	0.8339	0.9796	0.9647	0.9798	0.7067
DESVIO PADRÃO	0.0149	0.0264	0.0141	0.0214	0.0083	0.0435
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	0.9153 ATÉ 0.9737	0.7821 ATÉ 0.8858	0.9520 ATÉ 1.007	0.9227 ATÉ 1.007	0.9636 ATÉ 0.9961	0.6216 ATÉ 0.7919
VALOR DE P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.000485 8

4.9.3 HIV BioM

As condições de acoplamento tiveram respectivamente os seguintes valores de AUC, de *cutoff*, sensibilidade e especificidade: PBS 25µg/ml 0.9971, 268, 100% e 97.5%; PBS 50µg/ml 1.000, 488, 100% e 99.4%; CARBO 25µg/ml 0.8946, 54, 96.4% e 37.9%; MES 25µg/ml 0.9947, 247, 100% e 93.2%

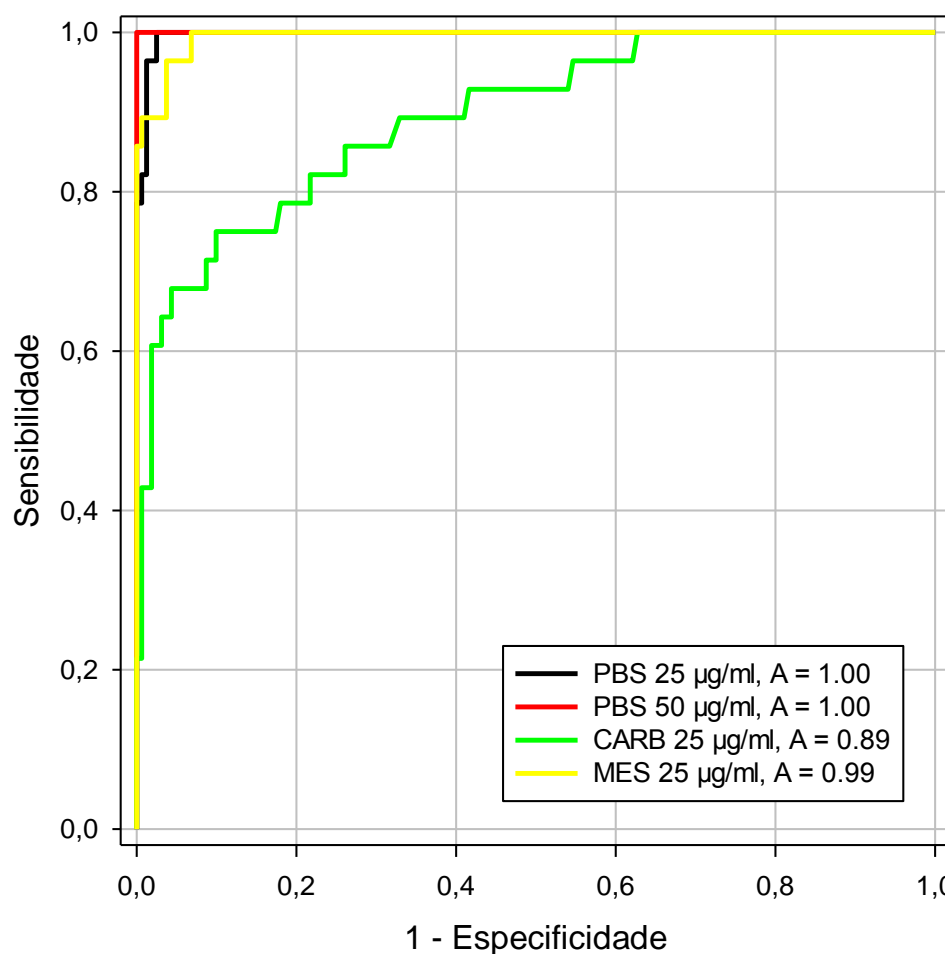


Figura 4.26 - Gráfico da Curva ROC das diferentes condições dos acoplamentos do antígeno HIV BioM das diferentes condições avaliadas; (A) Corresponde a área do abaixo da Curva ROC calculada pela análise da curva ROC.

A partir da análise dos resultados Tabela 4.33 as condições PBS 25µg/ml e PBS 50µg/ml apresentaram os melhores resultados, pois apresentaram os maiores valores de AUC, assim como, de sensibilidade/especificidade. Foi escolhido o PBS 50µg/ml como a melhor condição de acoplamento para o multiteste por esta apresentar uma AUC de 1.000, cutoff 488, sensibilidade 100% e especificidade 99.4%. Quando comparamos as curvas ROC e suas AUC dos resultados obtidos na (Figura 4.26) observa-se a diferença entre estas mostrando que realmente a condição escolhida tem um desempenho melhor que as outras.

Além disso, quando comparamos os MIF obtidos entre os diferentes resultados mostrados na Figura 4.26 observa-se que esta condição apresenta também os maiores e diferentes valores de MIF das amostras positivas permitindo uma separação maior entre as populações das amostras positivas e negativas, e mostrando que esta é capaz de determinar diferentes intensidades de resposta devido à dispersão dos valores de MFI obtidos.

TABELA 4.33 - ACOPLAMENTOS HIV BIOM

DOENÇA	HIV	HIV	HIV	HIV
ANTIGENO	BIOM	BIOM	BIOM	BIOM
TAMPÃO	PBS	PBS	CARBO	MES
[ACOPLAMENTO]	25	50	25	25
CUTOFF	268	488	54	247
NEGATIVOS	161	161	161	161
NEGATIVOS VERDADEIROS	157	160	61	150
POSITIVOS	28	28	28	28
POSITIVOS VERDADEIROS	28	28	27	28
FALSO POSITIVOS	4	1	100	11
SENSIBILIDADE	100.0%	100.0%	96.4%	100.0%
ESPECIFICIDADE	97.5%	99.4%	37.9%	93.2%
TOTAL AMOSTRAS	189	189	189	189
ÁREA DA CURVA ROC	0.9971	1.0000	0.8946	0.9947
DESVIO PADRÃO	0.0022	0.0000	0.03405	0.003552
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	0.9928 ATÉ 1.001	1.000 ATÉ 1.000	0.8279 ATÉ 0.9614	0.9877 ATÉ 1.002
VALOR DE P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

4.9.4 HIV 2 GP36

As condições de acoplamento tiveram respectivamente os seguintes valores de AUC, de *cutoff*, sensibilidade e especificidade: PBS 25 µg/ml 0.9907, 2011, 100% e 98%; CARBO 25 µg/ml 0.9936, 1361, 100% e 98%; MES 25 µg/ml 0.9928, 1698, 100% e 98.6%.

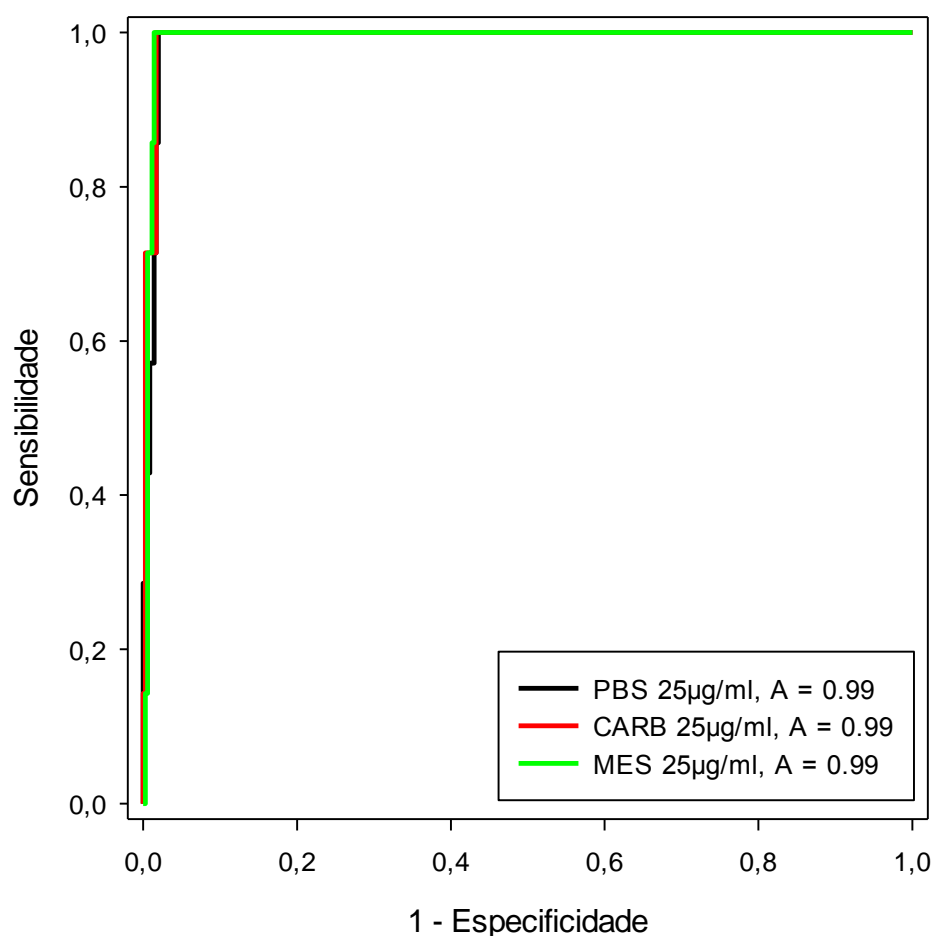


FIGURA 4.27 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HIV GP36 DAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC

A partir da análise dos resultados Tabela 4.34 todas as condições apresentaram excelentes resultados com altos valores de AUC, assim como, de sensibilidade/especificidade e MIF. Foi escolhido o CARBO 25 µg/ml como a melhor condição de acoplamento para o multiteste por esta apresentar uma AUC de 0.9936, cutoff 1361, sensibilidade 100% e especificidade 98%. Quando comparamos as curvas ROC e suas AUC dos resultados obtidos na Figura 4.27 observa-se a diferença entre estas mostrando que realmente a condição escolhida tem um desempenho melhor que as outras. Além disso, quando comparamos os MIF obtidos entre os diferentes resultados mostrados na Figura 4.27 observa-se que esta condição apresenta também os maiores e diferentes valores de MIF das amostras positivas permitindo uma separação maior entre as populações das amostras

positivas e negativas, e mostrando que está de determinar diferentes intensidades de resposta devido à dispersão dos valores de MFI obtidos.

TABELA 4.34 – ACOPLAMENTOS HIV2 GP36

DOENÇA	HIV2	HIV2	HIV2
ANTÍGENO	GP36	GP36	GP36
TAMPÃO	PBS	CARBO	MÊS
[ACOPLAMENTO]	25	25	25
CUTOFF	2011	1361	1698
NEGATIVOS	355	355	355
NEGATIVOS VERDADEIROS	348	348	350
POSITIVOS	7	7	7
POSITIVOS VERDADEIROS	7	7	7
FALSO POSITIVOS	7	7	5
SENSIBILIDADE	100.0%	100.0%	100.0%
ESPECIFICIDADE	98.0%	98.0%	98.6%
TOTAL AMOSTRAS	362	362	362
ÁREA DA CURVA ROC	0.9907	0.9936	0.9928
DESVIO PADRÃO	0.0048	0.0041	0.0042
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	0.9812	0.9856	0.9845
VALOR DE P	ATÉ 1.000	ATÉ 1.002	ATÉ 1.001
	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

4.9.5 HIV1 GP41

As condições de acoplamento tiveram respectivamente os seguintes valores de AUC, de *cutoff*, sensibilidade e especificidade: CARBO 25 µg/ml 1.000, 1631, 100% e 100%; PBS 25 µg/ml 1.000, 547, 100% e 100%; MES 25 µg/ml 1.000, 773, 100% e 100%; e PBS 50 µg/ml 1.000, 795, 100% e 100%.

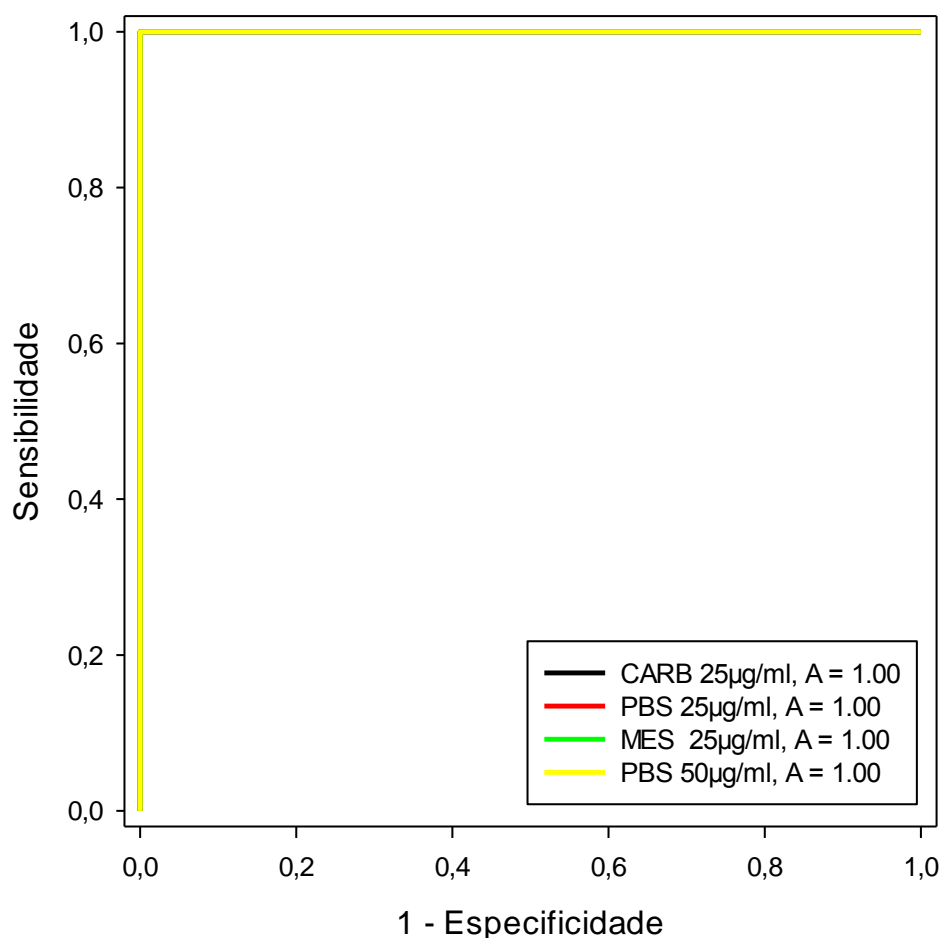


FIGURA 4.281 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HIV GP41 DAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC

A partir da análise dos dados da Tabela 4.35 todas as condições apresentaram excelentes resultados com altos valores de AUC, assim como, de sensibilidade/especificidade e MIF. Foi escolhido o PBS 25µg/ml como a melhor condição de acoplamento para o multiteste por esta apresentar uma AUC de 1.000, cutoff 795, sensibilidade 100% e especificidade 100%. Quando comparamos as curvas ROC e suas AUC dos resultados obtidos na Figura 4.28 observa-se a diferença entre estas mostrando que realmente a condição escolhida tem um desempenho melhor que as outras.

TABELA 4.35 – ACOPLAMENTOS HIV GP41

DOENÇA	HIV	HIV	HIV	HIV
ANTÍGENO	GP41	GP41	GP41	GP41
TAMPÃO	CARBO	PBS	MÊS	PBS
[ACOPLAMENTO]	25 µG/ML	25 µG/ML	25 µG/ML	450 µG/ML
CUTOFF	1631	547	773	795
NEGATIVOS	162	162	162	161
NEGATIVOS VERDADEIROS	162	162	162	161
POSITIVOS	27	27	27	28
POSITIVOS VERDADEIROS	27	27	27	28
FALSO POSITIVOS	0	0	0	0
SENSIBILIDADE	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
ESPECIFICIDADE	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
TOTAL AMOSTRAS	189	189	189	189
ÁREA DA CURVA ROC	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
DESVIO PADRÃO	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	1.000 ATÉ 1.000	1.000 ATÉ 1.000	1.000 ATÉ 1.000	1.000 ATÉ 1.000
VALOR DE P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

4.9.6 Comparação entre as melhores condições dos antígenos de HIV

A fim de determinar o melhor antígeno ou a combinação de antígenos para o se obter o melhor teste, os resultados dos melhores acoplamentos foram comparados entre si através da comparação das áreas das curvas ROC e teste de Combinação Antígeno + Antígeno.

DOENÇA	HIV	HIV12	HIV	HIV2	HIV
TESTE	1	2	3	4	5
ANTÍGENO	HIV GAG P17-24, GP41-120 (HIV1 MAG)	HIV1 ENV CONJ GP 39 HIV2 (HIV12)	BIOM	GP36	GP41
TAMPÃO	PBS	CARBO	PBS	CARBO	PBS
[ACOPLAMENTO]	50 µG/ML	50 µG/ML	50 µG/ML	25µG/ML	25µG/ML
CUTOFF	248	270	488	1361	547
NEGATIVOS	161	161	161	355	162
NEGATIVOS VERDADEIROS	150	157	160	348	162
POSITIVOS	28	28	28	7	27
POSITIVOS VERDADEIROS	28	27	28	7	27
FALSO POSITIVOS	11	4	1	7	0
TOTAL AMOSTRAS	362	189	189	362	189
SENSIBILIDADE	100.00%	96.40%	100.00%	100.00%	100.00%
ESPECIFICIDADE	93.20%	97.50%	99.40%	98.00%	100.00%
TAXA DE FALSO POSITIVOS	6.40%	2%	1%	2%	0%
ACURÁCIA	95%	97%	99%	98%	100%
PRECISÃO	72%	87%	97%	50%	100%

VALOR PREDITIVO NEGATIVO	100%	99%	100%	100%	100%
ÁREA DA CURVA ROC	0.9947	0.9796	1.0000	0.9936	1.0000
DESVIO PADRÃO	0.3552	0.0141	0.0000	0.0041	0.0000
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	0.9877 ATÉ 1.0	0.9520 ATÉ 1.007	1.000 ATÉ 1.000	0.9856 ATÉ 1.002	1.000 ATÉ 1.000
VALOR DE P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

A comparação entre os resultados das curvas ROC dos antígenos de HIV Tabela 4.36 apresentou uma diferença de área de resultados estatisticamente significativa com todos os valores de $P > 1$.

TABELA 4.36 COMPARAÇÃO DAS CURVAS ROC DOS MELHORES ANTÍGENOS PARA HIV

	HIV1 MAG, HIV12	HIV1 MAG, BIOM	HIV1 MAG, GP36	HIV1 MAG, GP41	HIV12, BIOM	HIV12, GP36
DIFERENÇA DE ÁREA	1.508	-5.324	1.115	-5.324	-2.041	-1.397
ERRO PADRÃO	1.449	3.552	5.407	3.552	1.405	1.463
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	-0.01332 ATÉ 0.043	-0.01229 ATÉ 0.001	-0.009482 ATÉ 0.01	-0.01229 ATÉ 0.001	-0.04795 ATÉ 0.007	-0.04265 ATÉ 0.014
ESTATÍSTICA Z	1.0407	-1.4988	2.0618	-1.4988	-1.4523	-9.5476
VALOR DE P	2.9801	1.3393	8.3665	1.3393	1.4642	3.3970

	HIV12, GP41	BIOM, GP36	BIOM, GP41	GP36, GP41
DIFERENÇA DE ÁREA	-2.041	6.439	0.000	-6.439
ERRO PADRÃO	1.405	4.076		4.076
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	-0.04795 ATÉ 0.007	-0.001550 ATÉ 0.01		-0.01443 ATÉ 0.001
ESTATÍSTICA Z	-1.4523	1.5796		-1.5796
VALOR DE P	1.4642	1.1419		1.1419

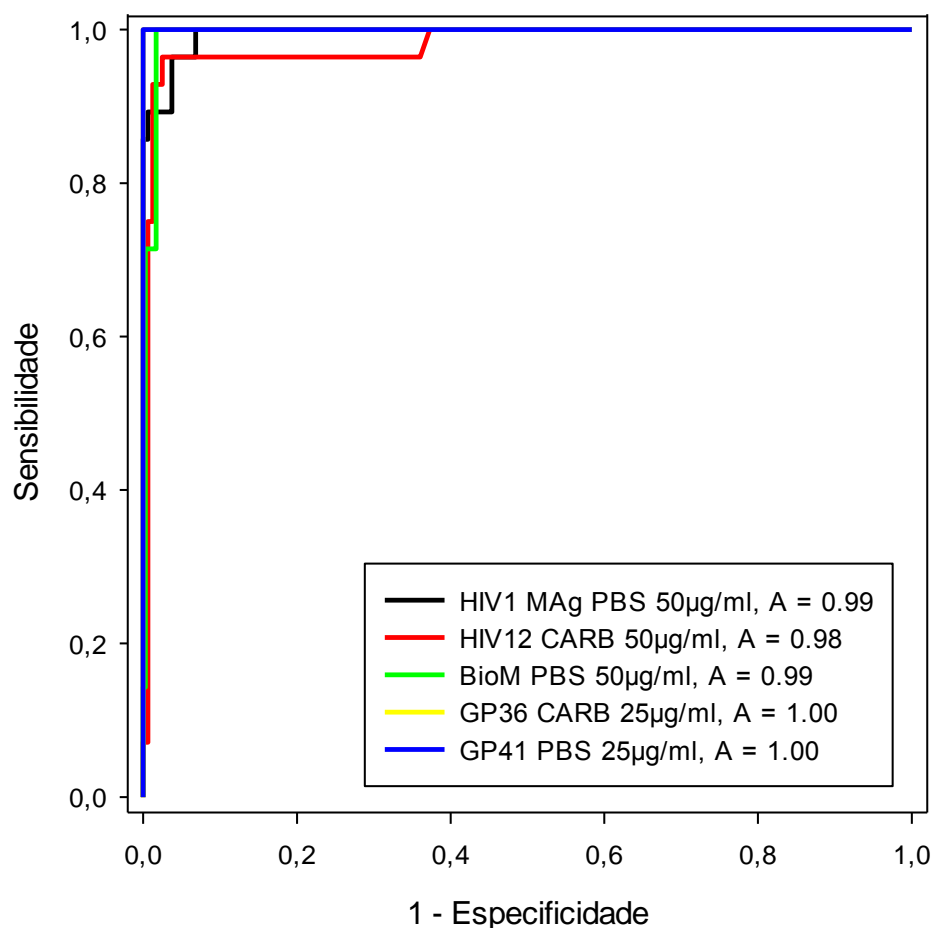


FIGURA 4.29 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DOS ANTÍGENOS; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC

A análise de Combinação Antígeno + Antígeno Tabela 4.37 onde os resultados de sensibilidade/especificidade e acurácia/precisão são respectivamente mostrados mostra que a combinação BioM e GP41 teria o melhor desempenho para o diagnóstico do HIV1 com 100% para todos os parâmetros avaliados. Como estes não seriam suficientes na determinação de HIV2 foi também utilizado o Multiantígeno HIV12 e HIV1 para o multitest.

TABELA 4.37 - ANÁLISE TABELA DE COMBINAÇÃO ANTÍGENO + ANTÍGENO – ANTÍGENO X ANTÍGENO

	HIV1 MAG X HIV12	HIV1 MAG X BIOM	HIV1 MAG X GP36	HIV1 MAG X GP41	HIV1 2 X BIOM	HIV1 2 X GP36	HIV1 2 X GP41	BIOM X GP36	BIOM X GP41
POS VER	27	27	35	27	27	34	27	35	28
NEG VER	146	149	309	150	156	316	157	319	160
POS FAL	15	12	18	11	5	11	4	8	1
NEG FAL	1	1	0	1	1	1	1	0	0
	189	189	362	189	189	362	189	362	189
SENSIBILIDADE	96%	96%	100%	96%	96%	97%	96%	100%	100%
ESPECIFICIDADE	90.7%	92.5%	94.5%	93.2%	96.9%	96.6%	97.5%	97.6%	99.4%
TX DE FALSOS POS	9.32%	7.45%	5.50%	6.83%	3.11%	3.36%	2.48%	2.45%	0.62%
ACURÁCIA	92%	93%	95%	94%	97%	97%	97%	98%	99%
PRECISÃO	64%	69%	66%	71%	84%	76%	87%	81%	97%
VALOR PRED NEG	99%	99%	100%	99%	99%	100%	99%	100%	100%

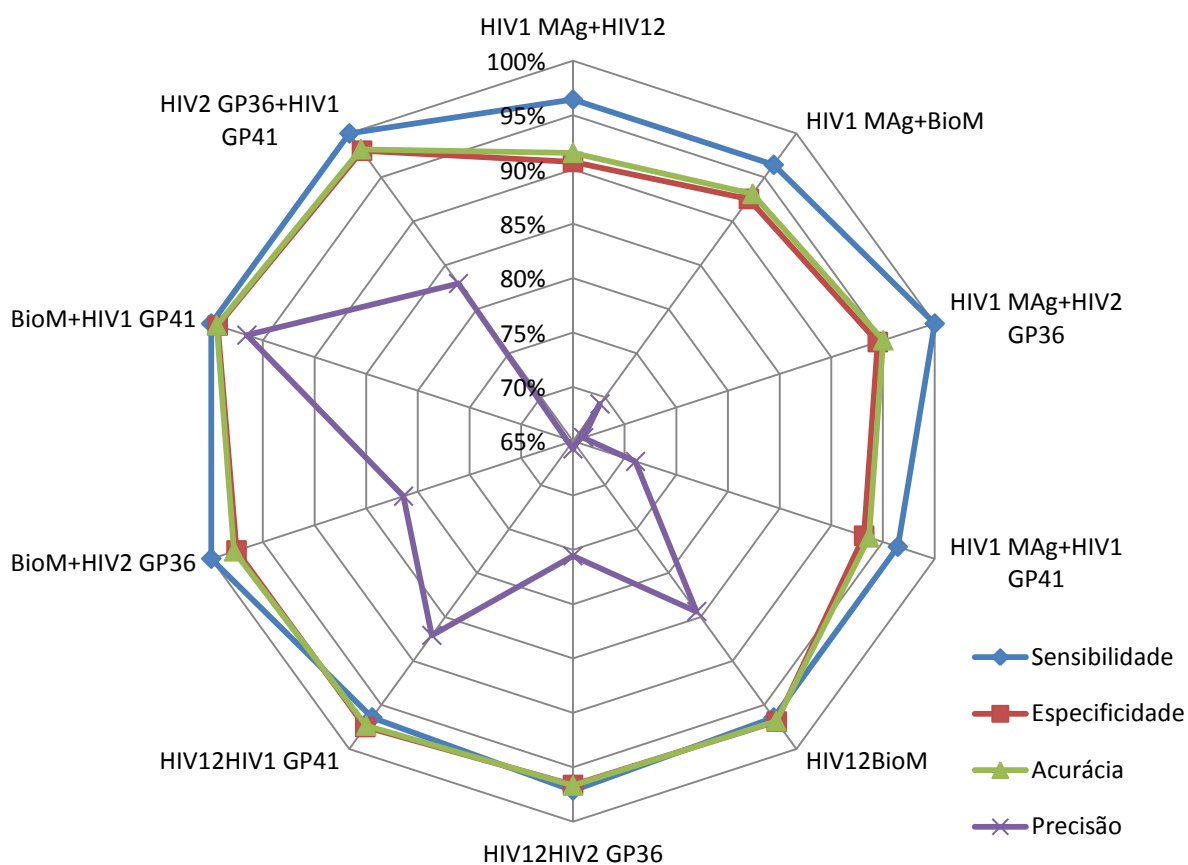


FIGURA 4.30- GRÁFICO DOS PARÂMETROS OBTIDOS DA ANÁLISE DE COMBINAÇÃO ANTÍGENO + ANTÍGENO DE HIV UTILIZADOS PARA AVALIAR A COMBINAÇÃO DOS ANTÍGENOS. (A) CORRESPONDE A ÁREA ABAIXO DA CURVA CALCULADA PELA ANÁLISE CURVA ROC

4.10 ACOPLAMENTOS DOS ANTÍGENOS PARA HTLV

4.10.1 HTLV ENV

As condições de acoplamento tiveram respectivamente os seguintes valores de AUC, de *cutoff*, sensibilidade e especificidade: MES 100 μ g/ml: 0.991, 194, 100% e 90.7%; MES 25 μ g/ml: 0.865, 18, 100% e 55.7%; PBS 25 μ g/ml: 0.976, 26, 100% e 85.5%; PBS 25 μ g/ml 0.9035, 50, 100% e 42.2%; CARBO 25 μ g/ml: 0.6999, 26, 100% e 85.5%; MES5 10 μ g/ml: 0.9454, 47, 96.4% e 75.2%; e MES 10 μ g/ml: 0.9592, 130, 96.4% e 87.0%.

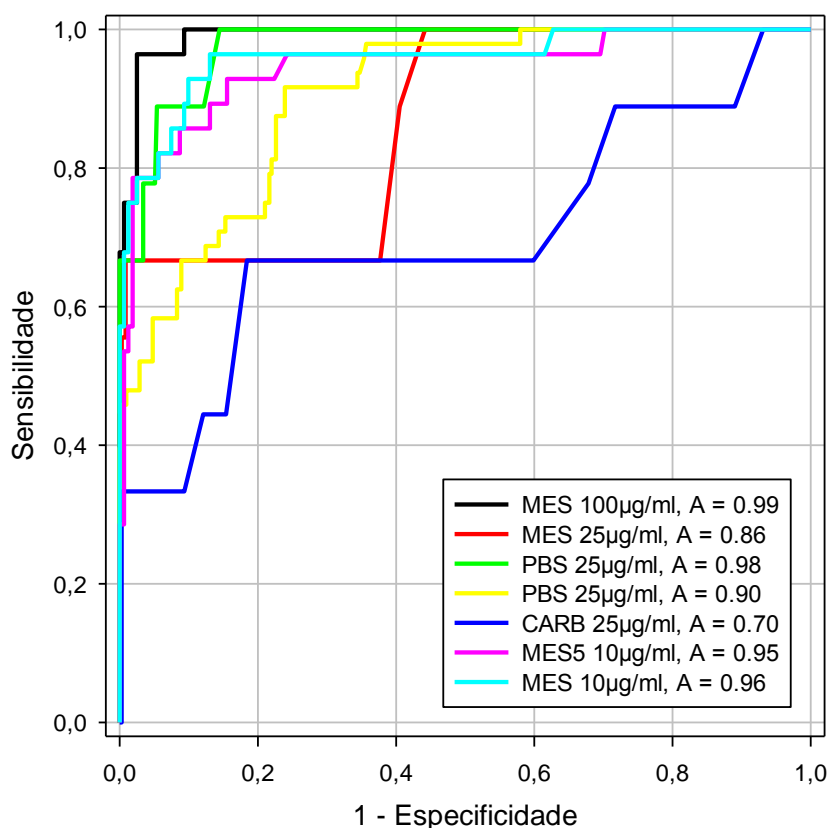


FIGURA 1.5.1.1 1 - GRÁFICO DA CURVA ROC HTLV ENV DAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS; (A) CORRESPONDE A ÁREA ABAIXO DA CURVA CALCULADA PELA ANÁLISE CURVA ROC

A partir da análise dos resultados Tabela 4.38 as condições MES 100µg/ml: 0.991, 194, 100% e 90.7% e PBS 25µg/ml: 0.976, 26, 100% e 85.5%; apresentaram os melhores resultados, pois apresentaram os maiores valores de AUC, assim como, de sensibilidade/especificidade. Foi escolhido o 100µg/ml em MES como a melhor condição de acoplamento para o multitestes por esta apresentar uma AUC de 0,9947, cutoff 248, sensibilidade 100% e especificidade 93,2%. Quando comparamos as curvas ROC e suas AUC dos resultados obtidos na Figura 1.5.1.1 1 observa-se a diferença entre estas mostrando que realmente a condição escolhida tem um desempenho melhor que as outras.

TABELA 4.38 - ACOPLAMENTOS ENV

DOENÇA	HTLV	HTLV2	HTLV2	HTLV1	HTLV2	HTLV1	HTLV1
ANTÍGENO	ENV	ENV	ENV	ENV	ENV	ENV	ENV
TAMPÃO	MES	MES	PBS	PBS	CARBO	MES5	MÊS
[ACOPLAMENTO]	100	25	25	25	25	10	10
CUTOFF	194	18	26	50	6	47	130
NEGATIVOS	161	352	352	313	352	161	161
NEGATIVOS VERDADEIROS	146	196	301	132	24	121	140
POSITIVOS	28	9	9	48	9	28	28
POSITIVOS VERDADEIROS	28	9	9	48	9	27	27
FALSO POSITIVOS	15	156	51	181	328	40	21
SENSIBILIDADE	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	96.4%	96.4%
ESPECIFICIDADE	90.7%	55.7%	85.5%	42.2%	6.8%	75.2%	87.0%
TOTAL AMOSTRAS	189	361	361	361	361	189	189
ÁREA DA CURVA ROC	0.991	0.865	0.976	0.9035	0.6999	0.9454	0.9592
DESVIO PADRÃO	0.005	0.064	0.015	0.02065	0.1107	0.0266	0.02282
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	0.9810 ATÉ 1.001	0.7400 ATÉ 0.9896	0.9465 ATÉ 1.005	0.8630 ATÉ 0.9440	0.4829 ATÉ 0.9170	0.8933 ATÉ 0.9976	0.9144 ATÉ 1.004
VALOR DE P	< 0.0001	0.000	< 0.0001	< 0.0001	0.040	< 0.0001	< 0.0001

4.10.2 Acoplamento HTLV1 E1

Acoplamento HTLV1 E1 MÊS 25 µg/ml apresentou uma área sob a curva (Area Under Curve – AUC) de 0.970 Figura 4.31. A partir da análise da curva ROC (Receiver Operating Characteristic) foi possível determinar o valor de *cutoff* 163 para 96.4% de sensibilidade e maior especificidade possível 91.9% Tabela 4.39.

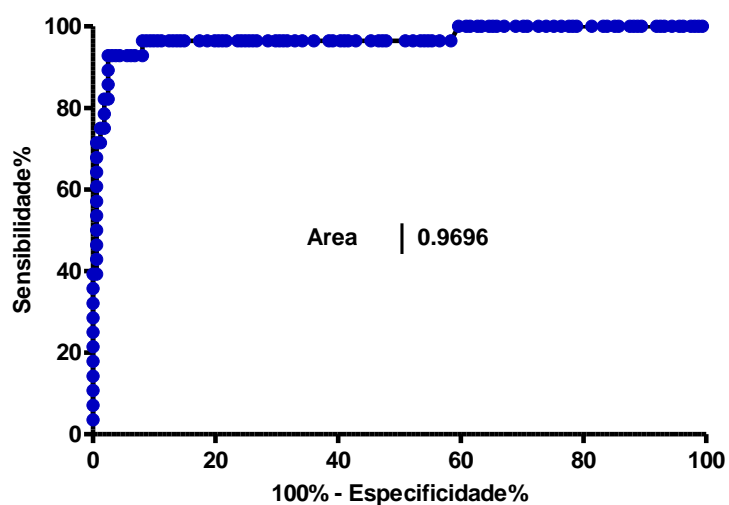


FIGURA 4.31 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HTLV1 E1 MVT PBS; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.

TABELA 4.39– ANÁLISE ROC HTLV1 E1

DOENÇA	HTLV1
ANTÍGENO	E1
TAMPÃO	MES
[ACOPLAMENTO]	25
CUTOFF	163
NEGATIVOS	161
NEGATIVOS VERDADEIROS	148
POSITIVOS	28
POSITIVOS VERDADEIROS	27
FALSO POSITIVOS	13
SENSIBILIDADE	96.4%
ESPECIFICIDADE	91.9%
TOTAL AMOSTRAS	189
ÁREA DA CURVA ROC	0.970
DESVIO PADRÃO	0.021
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	0.9281 ATÉ 1.011
VALOR DE P	< 0.0001

4.10.3 Acoplamento HTLV1 E701

Acoplamento HTLV1 E701 PBS 100 µg/ml apresentou uma área sob a curva (Area Under Curve – AUC) de 0.7247 Figura 4.32. A partir da análise da curva ROC (Receiver Operating Characteristic) foi possível determinar o valor de *cutoff* 11 para 96.4% de sensibilidade e maior especificidade possível 17.4% Tabela 4.40.

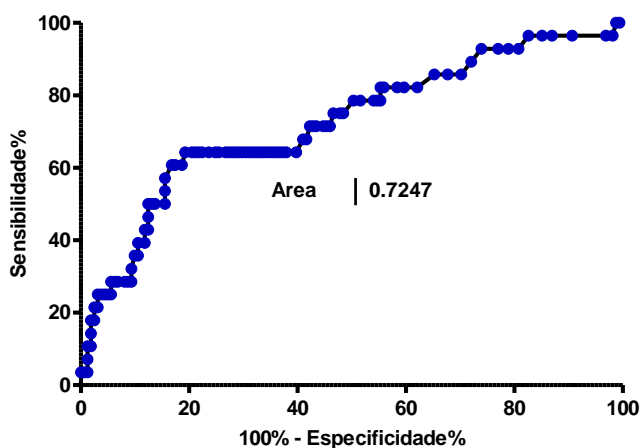


FIGURA 4.321 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HTLV1 E701 PBS 100 ; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC

TABELA 4.40 - ANÁLISE CURVA ROC HTLV E701

DOENÇA	HTLV1
ANTÍGENO	E701
TAMPÃO	PBS
[ACOPLAMENTO]	100 µG/ML
CUTOFF	11
NEGATIVOS	161
NEGATIVOS VERDADEIROS	28
POSITIVOS	28
POSITIVOS VERDADEIROS	27
FALSO POSITIVOS	133
SENSIBILIDADE	96.4%
ESPECIFICIDADE	17.4%
TOTAL AMOSTRAS	189
ÁREA DA CURVA ROC	0.725
DESVIO PADRÃO	0.056
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	0.6140 ATÉ 0.8354
VALOR DE P	0.0001496

4.10.4

4.10.5 HTLV GP21

As condições de acoplamento tiveram respectivamente os seguintes valores de AUC, de *cutoff*, sensibilidade e especificidade: GP21 MES5 25µg/ml 0.722, 7, 97.9% e 12.6%; PBS 25µg/ml 0.886, 10, 96.4% e 52.8%; MES 25µg/ml 0.898, 25, 96.4% e 68.3%; MES 50µg/ml 0.9389, 197, 92.9% e 96.3%.

A

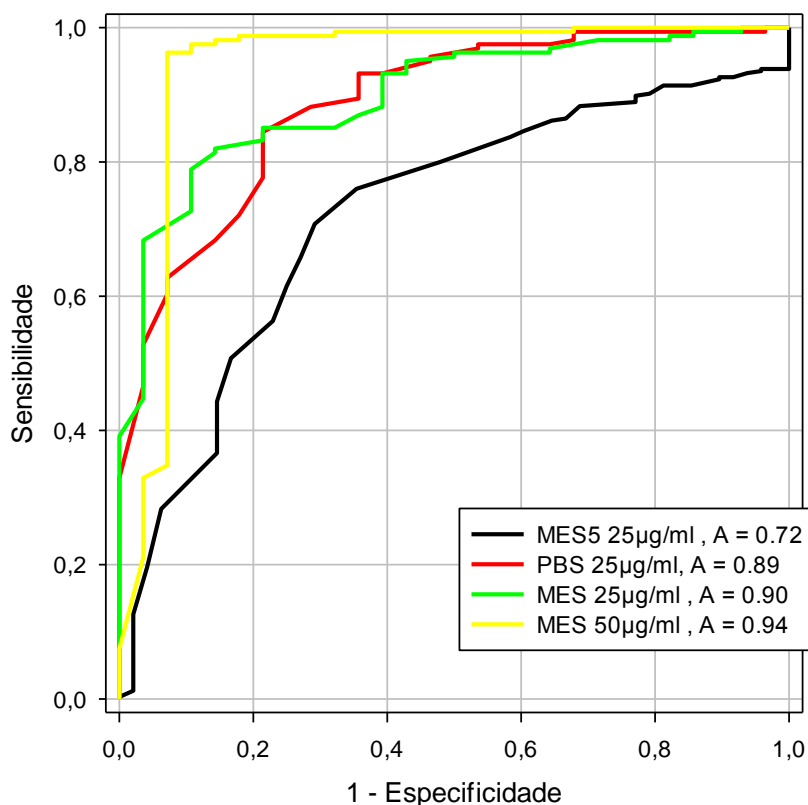


FIGURA 4.33 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HTLV GP21 DAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC

A partir da análise dos resultados Tabela 4.41 as condições MES 50µg/ml: 0.9389, 197, 92.9% e 96.3%; apresentaram os melhores resultados, pois apresentaram os maiores valores de AUC, assim como, de sensibilidade/especificidade. Foi escolhido o 50µg/ml em PBS como a melhor

condição de acoplamento para o multiteste. Quando comparamos as curvas ROC e suas AUC dos resultados obtidos na Figura 4.33 observa-se a diferença entre estas mostrando que realmente a condição escolhida tem um desempenho melhor que as outras.

TABELA 4.41 - ACOPLAMENTOS ROC HTLV1 GP21

DOENÇA	HTLV1	HTLV1	HTLV1	HTLV1
ANTÍGENO	GP21	GP21	GP21	GP21
TAMPÃO	MES5	PBS	MÊS	MÊS
[ACOPLAMENTO]	25	25	25	50
CUTOFF	7	10	25	197
NEGATIVOS	324	159	159	159
NEGATIVOS VERDADEIROS	41	154	154	153
POSITIVOS	48	28	28	28
POSITIVOS VERDADEIROS	47	15	27	26
FALSO POSITIVOS	283	5	5	6
SENSIBILIDADE	97.9%	96.4%	96.4%	92.9%
ESPECIFICIDADE	12.6%	52.8%	68.3%	96.3%
TOTAL AMOSTRAS	372	187	187	187
ÁREA DA CURVA ROC	0.722	0.886	0.898	0.9389
DESVIO PADRÃO	0.037	0.032	0.028	0.03734
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	0.6489 ATÉ 0.7945	0.8237 ATÉ 0.9491	0.8431 ATÉ 0.9519	0.8657 ATÉ 1.012
VALOR DE P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

4.10.6 HTLV1 GP46

As condições de acoplamento tiveram respectivamente os seguintes valores de AUC, de *cutoff*, sensibilidade e especificidade: GP46 CARBO 25µg/ml: 0.572, 11, 100% e 17.4%; PBS 25µg/ml: 0.700, 21, 100% e 25.5%; MES 25µg/ml: 0.474, 14, 100% e 8.3%.

A

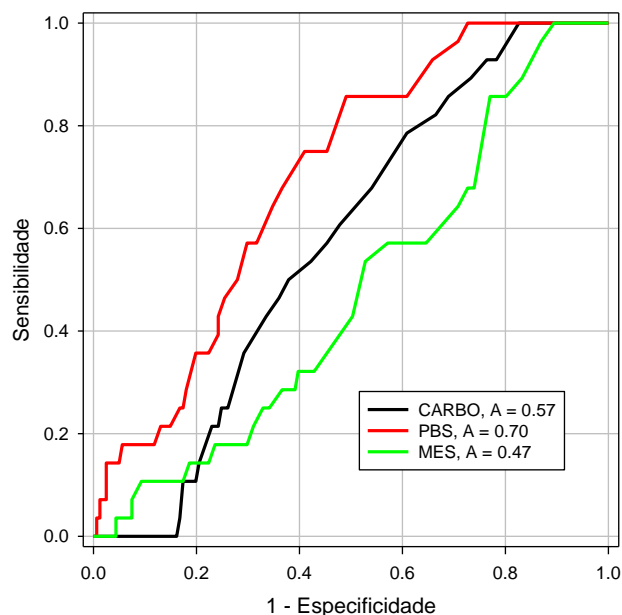


FIGURA 4.34 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HTLV GP46 DAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC

A partir da análise dos resultados Tabela 4.42 as condições PBS 25µg/ml: 0.700, 21, 100% e 25.5%; apresentaram os melhores resultados, pois apresentaram os maiores valores de AUC, assim como, de sensibilidade/especificidade. Foi escolhido o 50µg/ml em PBS como a melhor condição de acoplamento para o multiteste. Quando comparamos as curvas ROC e suas AUC dos resultados obtidos na Figura 4.34 observa-se a diferença entre estas mostrando que realmente a condição escolhida tem um desempenho melhor que as outras.

TABELA 4.42 - ACOPLAMENTOS HTLV1 GP46

DOENÇA	HTLV1	HTLV1	HTLV1
ANTÍGENO	GP46	GP46	GP46
TAMPÃO	CARBO	PBS	MÊS
[ACOPLAMENTO]	25	25	25
CUTOFF	11	21	14
NEGATIVOS	161	157	157
NEGATIVOS VERDADEIROS	28	40	13
POSITIVOS	28	28	28
POSITIVOS VERDADEIROS	28	28	28
FALSO POSITIVOS	133	117	144

SENSIBILIDADE	100.0%	100.0%	100.0%
ESPECIFICIDADE	17.4%	25.5%	8.3%
TOTAL AMOSTRAS	189	185	185
ÁREA DA CURVA ROC	0.572	0.700	0.474
DESVIO PADRÃO	0.048	0.045	0.054
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	0.4783 ATÉ 0.6652	0.6105 ATÉ 0.7888	0.3681 ATÉ 0.5802
VALOR DE P	0.2259	0.0007552	1.337

4.10.7 HTLV1 P24

As condições de acoplamento tiveram respectivamente os seguintes valores de AUC, de *cutoff*, sensibilidade e especificidade: P24 MES5 50µg/ml: 0.946, 11, 96.4% e 65.6%; MES 50µg/ml: 0.886, 12, 92.9% e 37.4%; PBS 50µg/ml: 0.872, 15, 92.9% e 38.6%; e CARBO 50µg/ml: 0.909, 11, 92.9% e 49.4%

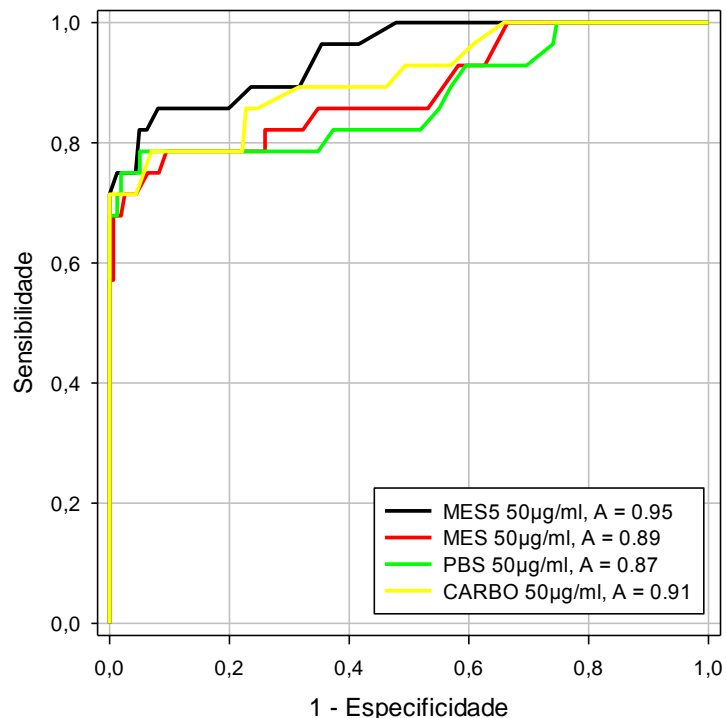


FIGURA 4.35 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HTLV P24 DAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC

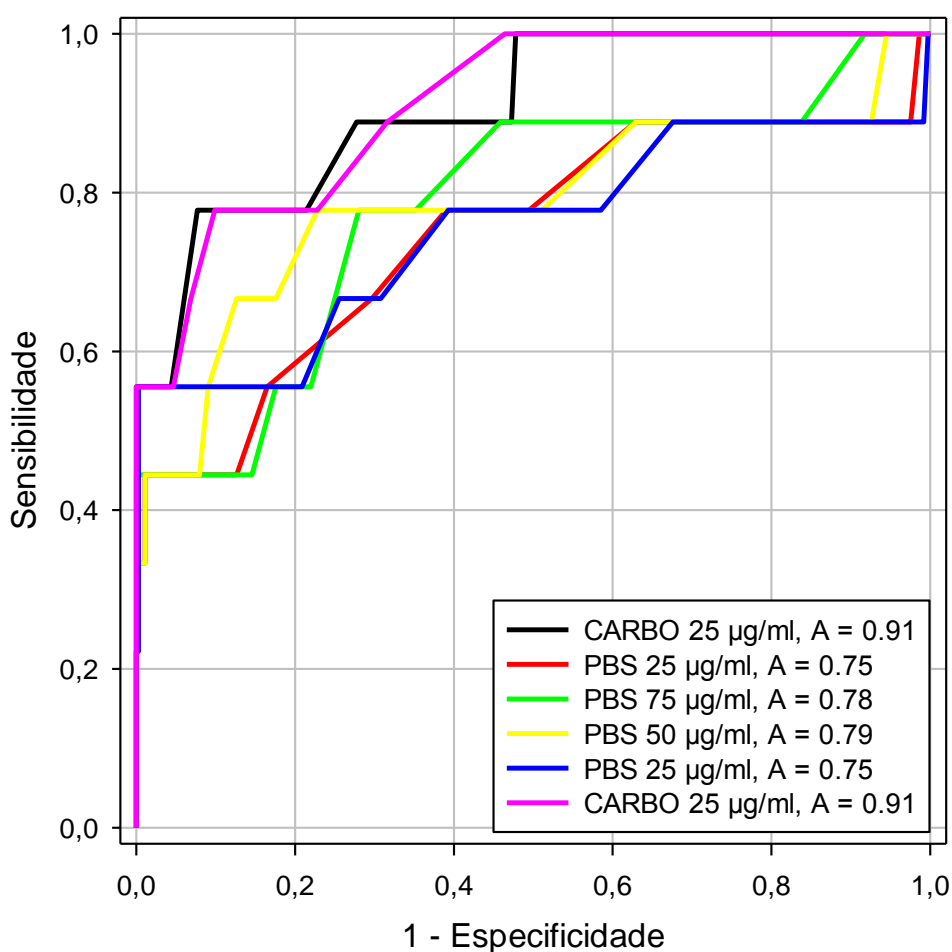
A partir da análise dos resultados Tabela 4.43 as condições MES5 50µg/ml: 0.946, 11, 96.4% e 65.6%; apresentaram os melhores resultados, pois apresentaram os maiores valores de AUC, assim como, de sensibilidade/especificidade. Foi escolhido o 50µg/ml em PBS como a melhor condição de acoplamento para o multiteste. Quando comparamos as curvas ROC e suas AUC dos resultados obtidos na Figura 4.35 observa-se a diferença entre estas mostrando que realmente a condição escolhida tem um desempenho melhor que as outras.

TABELA 4.43 - ACOPLAMENTOS HTLV1 P24

DOENÇA	HTLV1	HTLV1	HTLV1	HTLV1
ANTIGENO	P24	P24	P24	P24
TAMPÃO	MES5	MÊS	PBS	CARBO
[ACOPLAMENTO]	50	50	50	50
CUTOFF	11	12	15	11
NEGATIVOS	157	147	153	154
NEGATIVOS VERDADEIROS	103	55	59	76
POSITIVOS	28	28	28	28
POSITIVOS VERDADEIROS	27	26	26	26
FALSO POSITIVOS	54	92	94	78
SENSIBILIDADE	96.4%	92.9%	92.9%	92.9%
ESPECIFICIDADE	65.6%	37.4%	38.6%	49.4%
TOTAL AMOSTRAS	185	175	181	182
ÁREA DA CURVA ROC	0.946	0.886	0.872	0.909
DESVIO PADRÃO	0.024	0.041	0.047	0.035
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	0.9002 ATÉ 0.9923	0.8053 ATÉ 0.9673	0.7799 ATÉ 0.9642	0.8399 ATÉ 0.9748
VALOR DE P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

4.10.8 HTLV2 FAPON

As condições de acoplamento tiveram respectivamente os seguintes valores de AUC, de *cutoff*, sensibilidade e especificidade: HTLV2 FAPON CARBO 25µg/ml: 0.906, 7, 100% e 0.6%; PBS 100µg/ml: 0.747, 2, 100% e 25.4%; PBS 75µg/ml: 0.784, 5, 100% e 50.1%; PBS 50µg/ml: 0.787, 5, 88.9% e 35.1%; PBS 25µg/ml: 0.7538, 5, 100% e 28.9%; e CARBO 25µg/ml: 0.9107, 6, 100% e 52.5%



A

FIGURA 4.36 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO HTLV2 FAPON DAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.

A partir da análise dos resultados Tabela 4.44 as condições CARBO 25µg/ml: 0.9107, 6, 100% e 52.5%,apresentaram os melhores resultados, pois apresentaram os maiores valores de AUC, assim como, de sensibilidade/especificidade. Foi escolhido o 25µg/ml em CARBO como a melhor condição de acoplamento para o multiteste. Quando comparamos as curvas ROC e suas AUC dos resultados obtidos na Figura 4.36 observa-se a diferença entre estas mostrando que realmente a condição escolhida tem um desempenho melhor que as outras.

TABELA 4.44 - ACOPLAMENTOS HTLV2

DOENÇA	HTLV2	HTLV2	HTLV2	HTLV2	HTLV2	HTLV2
ANTÍGENO	FAPON	FAPON	FAPON	FAPON	FAPON	FAPON
TAMPÃO	CARBO	PBS	PBS	PBS	PBS	CARBO
[ACOPLAMENTO]	25	100	75	50	25	25
CUTOFF	7	2	5	5	5	6
NEGATIVOS	175	307	335	353	346	356
NEGATIVOS VERDADEIROS	1	78	168	124	100	187
POSITIVOS	9	8	8	9	8	9
POSITIVOS VERDADEIROS	9	8	8	8	8	9
FALSO POSITIVOS	174	229	167	229	246	169
SENSIBILIDADE	100.0%	100.0%	100.0%	88.9%	100.0%	100.0%
ESPECIFICIDADE	0.6%	25.4%	50.1%	35.1%	28.9%	52.5%
TOTAL AMOSTRAS	184	315	343	362	354	365
ÁREA DA CURVA ROC	0.906	0.747	0.784	0.787	0.7538	0.9107
DESVIO PADRÃO	0.052	0.106	0.091	0.103	0.1125	0.0461
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	0.08043 ATÉ 1.009	0.5398 ATÉ 0.9544	0.6049 ATÉ 0.9632	0.5853 ATÉ 0.9892	0.5334 ATÉ 0.9742	0.8204 ATÉ 1.001
VALOR DE P	< 0.0001	0.0113	0.003591	0.103	0.1125	0.0461

4.10.9 Comparação entre as melhores condições dos antígenos de HTLV

A fim de determinar o melhor antígeno ou a combinação de antígenos para o se obter o melhor teste, os resultados dos melhores acoplamentos foram comparados entre si através da comparação das áreas das curvas ROC e teste de Combinação Antígeno + Antígeno.

TABELA 4.45 – COMPARAÇÃO ENTRE AS CONDIÇÕES DE ACOPLAMENTO

DOENÇA	HTLV	HTLV2	HTLV1	HTLV1	HTLV 1	HTLV1	HTLV1	HTLV 2
ANTÍGENO	ENV	ENV	E1	E701	GP21	GP46	P24	FAPO N
TAMPÃO	MES	PBS	MÊS	PBS	MÊS	PBS	MES5	CARB O
[ACOPLAMENTO]	100 µG/ML	25 µG/ML	25 µG/ML	100 µG/ML	50 µG/ML	25 µG/ML	50 µG/ML	25 µG/ML
CUTOFF	194	26	163	11	197	21	11	6
NEGATIVOS	161	352	161	161	159	157	157	356
NEGATIVOS VERDADEIROS	146	301	148	28	153	40	103	187
POSITIVOS	28	9	28	28	28	28	28	9

POSITIVOS VERDADEIROS	28	9	27	27	26	28	27	9
FALSO POSITIVOS	15	51	13	133	6	117	54	169
TOTAL AMOSTRAS	189	361	189	189	187	185	185	365
SENSIBILIDADE	100%	100%	96%	96%	93%	100%	96%	100%
ESPECIFICIDADE	91%	86%	92%	17%	96%	26%	66%	53%
TAXA DE FALSO POSITIVOS	9%	14%	8%	83%	4%	75%	34%	47%
ACURÁCIA	92%	86%	93%	29%	96%	37%	70%	54%
PRECISÃO	65%	15%	68%	17%	82%	19%	33%	5%
VALOR PREDITIVO NEGATIVO	100%	100%	99%	97%	99%	100%	99%	100%
ÁREA DA CURVA ROC	0.991	0.976	0.970	0.725	0.939	0.700	0.946	0.911
DESVIO PADRÃO	0.005	0.015	0.021	0.056	0.037	0.045	0.024	0.046
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	0.9810 ATÉ 1.001	0.9465 ATÉ 1.005	0.9281 ATÉ 1.011	0.6140 ATÉ 0.8354	0.8657 ATÉ 1.012	0.6105 ATÉ 0.7888	0.9002 ATÉ 0.9923	0.8204 ATÉ 1.001
VALOR DE P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.0001	< 0.0001	0.0007 552	< 0.0001	0.0461

TABELA 4.46 – COMPARAÇÃO DAS CURVAS ROC

COMPARAÇÃO CURVAS ROC							
	HTLV1 ENV, HTLV2 ENV	HTLV1 ENV, HTLV1 E1	HTLV1 ENV, HTLV1 E701	HTLV1 ENV, HTLV1 GP21	HTLV1 ENV, HTLV1 GP46	HTLV1 ENV, HTLV1 P24	HTLV1 ENV, HTLV2 FAPON
DIFERENÇA DE ÁREA	1.530	2.130	2.662	5.202	2.913	4.470	8.019
ERRO PADRÃO	1.571	2.175	5.671	3.768	4.575	2.404	4.638
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	-0.01549 ATÉ 0.046	-0.02134 ATÉ 0.063	0.1550 ATÉ 0.3773	-0.0218 4 ATÉ 0.125	0.2016 ATÉ 0.3809	-0.002416 ATÉ 0.09	-0.01072 ATÉ 0.171
ESTATÍSTICA Z	9.739	9.789	4.694	1.381	6.367	1.860	1.729
VALOR DE P	3.301	3.276	< 0.0001	1.674	< 0.0001	6.295	8.382

	HTLV2 ENV, HTLV1 E1	HTLV2 ENV, HTLV1 E701	HTLV2 ENV, HTLV1 GP21	HTLV2 ENV, HTLV1 GP46	HTLV2 ENV, HTLV1 P24	HTLV2 ENV, HTLV2 FAPON	HTLV1 E1, HTLV1 E701
DIFERENÇA DE ÁREA	5.996	2.509	3.672	2.760	2.940	6.489	2.449
ERRO PADRÃO	2.586	5.841	4.019	4.783	2.781	4.844	6.032
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	-0.04468 ATÉ 0.056	0.1364 ATÉ 0.3654	-0.04205 ATÉ 0.115	0.1822 ATÉ 0.3697	-0.02510 ATÉ 0.083	-0.03005 ATÉ 0.159	0.1267 ATÉ 0.3631
ESTATÍSTICA Z	2.319	4.296	9.137	5.769	1.057	1.340	4.060
VALOR DE P	8.166	< 0.0001	3.609	< 0.0001	2.904	1.804	< 0.0001

	HTLV1 E1,	HTLV1 E1,	HTLV1 E1,	HTLV1 E1,	HTLV1 E701,	HTLV1 E701,	HTLV1 E701,
--	-----------	-----------	-----------	-----------	-------------	-------------	-------------

	HTLV1 GP21	HTLV1 GP46	HTLV1 P24	HTLV2 FAPON	HTLV1 GP21	HTLV1 GP46	HTLV1 P24
DIFERENÇA DE ÁREA	3.072	2.700	2.340	5.890	-2.142	2.507	-2.215
ERRO PADRÃO	4.292	5.015	3.162	5.073	6.771	7.251	6.118
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	-0.05339 ATÉ 0.114	0.1717 ATÉ 0.3682	-0.03857 ATÉ 0.085	-0.04053 ATÉ 0.158	-0.3469 ATÉ - 0.081	-0.1170 ATÉ 0.1672	-0.3414 ATÉ - 0.101
ESTATÍSTICA Z	7.159	5.384	7.402	1.161	-3.163	3.457	-3.621
VALOR DE P	4.740	< 0.0001	4.592	2.456	1.561	7.296	2.940

	HTLV1 E701, HTLV2 FAPON	HTLV1 GP21, HTLV1 GP46	HTLV1 GP21, HTLV1 P24	HTLV1 GP21, HTLV2 FAPON	HTLV1 GP46, HTLV1 P24	HTLV1 GP46, HTLV2 FAPON	HTLV1 P24, HTLV2 FAPON
DIFERENÇA DE ÁREA	-1.860	2.392	-7.320	2.817	-2.466	-2.111	3.549
ERRO PADRÃO	7.291	5.883	4.412	5.933	5.118	6.475	5.175
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	-0.3289 ATÉ - 0.043	0.1239 ATÉ 0.3546	-0.09379 ATÉ 0.079	-0.08811 ATÉ 0.144	-0.3469 ATÉ - 0.146	-0.3380 ATÉ - 0.084	-0.06593 ATÉ 0.136
ESTATÍSTICA Z	-2.551	4.067	-1.659	4.749	-4.818	-3.260	6.859
VALOR DE P	1.074	< 0.0001	8.682	6.349	< 0.0001	1.115	4.928

A comparação entre os resultados das curvas ROC dos antígenos de HTLV Tabela 4.46 apresentou uma diferença de área de resultados estatisticamente significativa com todos os valores de $P > 1$, mas também apresentou resultados estatisticamente relevantes com $P < 0.0001$, HTLV2 ENV+ HTLV1 E701, HTLV2 ENV+ HTLV1 GP46, HTLV1 E1+ HTLV1 E701, HTLV1 E1+ HTLV1 GP46, HTLV1 GP21+ HTLV1 GP46, HTLV1 GP46+ HTLV1 P24, HTLV1 ENV+ HTLV1 E701, HTLV1 ENV+ HTLV1 GP46 indicando que esses resultados são consistentes.

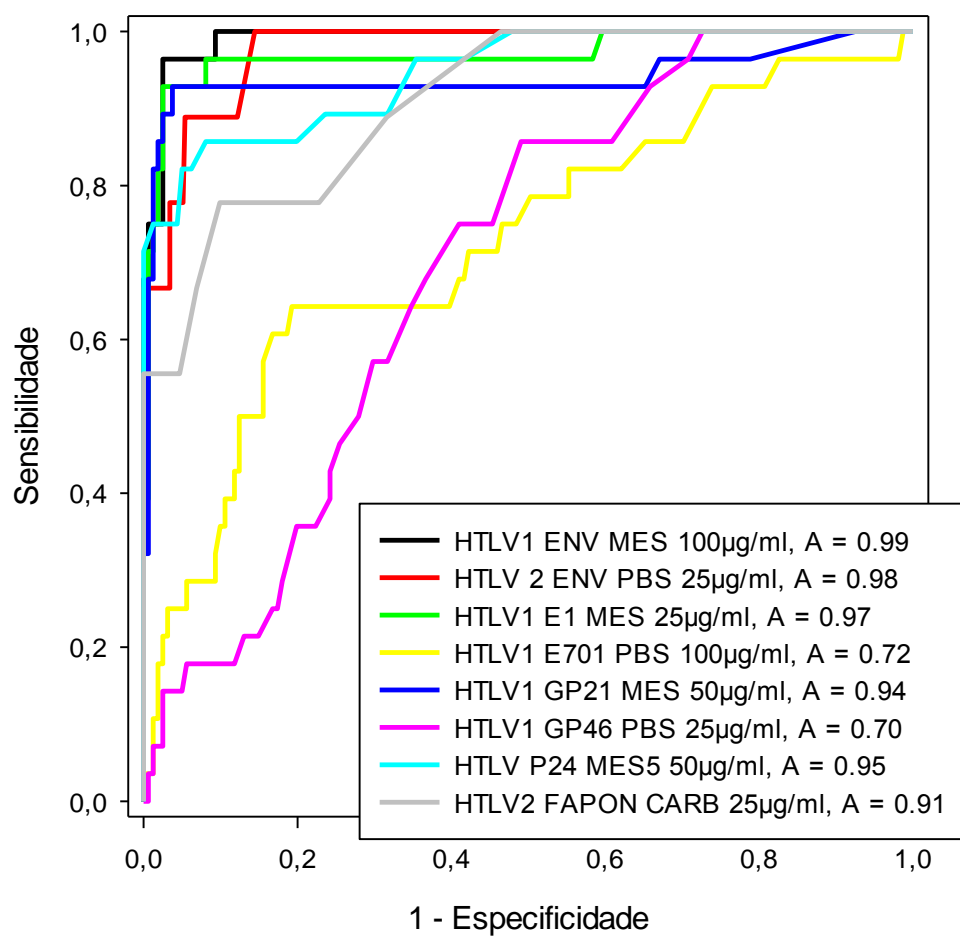


FIGURA 4.37 - GRÁFICO DA CURVA ROC HTLV DAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS; (A) CORRESPONDE A ÁREA ABAIXO DA CURVA CALCULADA PELA ANÁLISE CURVA ROC

A análise de Combinação Antígeno + Antígeno Tabela 4.47 onde os resultados de sensibilidade/especificidade e acurácia/precisão são respectivamente mostrados mostra que a combinação HTLV1 E1 + HTLV1 GP21 teria o melhor desempenho para o diagnóstico do com 89%/88% Sensibilidade / Especificidade e 88%/57% Precisão/Acurácia para todos os parâmetros avaliados.. Como estes não seriam suficientes na determinação de HTLV2 foi utilizado também utilizado o Multiantígeno HTIV2 ENV para o multiteste.

TABELA 4.47 – ANÁLISE DE ANTIGENO+ANTIGENO

	HTLV1 ENV, HTLV2 ENV	HTLV1 ENV, HTLV1 E1	HTLV1 ENV, HTLV1 E701	HTLV1 ENV, HTLV1 GP21	HTLV1 ENV, HTLV1 GP46	HTLV1 ENV, HTLV1 P24	HTLV1 ENV, HTLV2 FAPON
POS VER	37	27	27	26	27	27	37
NEG VER	258	133	13	138	25	88	144
POS FAL	66	28	148	21	132	69	184
NEG FAL	0	1	1	2	1	1	0
	361	189	189	187	185	185	365
SENSIBILIDADE	100%	96%	96%	93%	96%	96%	100%
ESPECIFICIDADE	79.6%	82.6%	8.1%	86.8%	15.9%	56.1%	43.9%
TAXA DE FALSOS POSITIVOS	20.37%	17.39%	91.93%	13.21%	84.08%	43.95%	56.10%
ACURÁCIA	82%	85%	21%	88%	28%	62%	50%
PRECISÃO	36%	49%	15%	55%	17%	28%	17%
VALOR PREDITIVO NEGATIVO	100%	99%	93%	99%	96%	99%	100%

	HTLV2 ENV, HTLV1 E1	HTLV2 ENV, HTLV1 E701	HTLV2 ENV, HTLV1 GP21	HTLV2 ENV, HTLV1 GP46	HTLV2 ENV, HTLV1 P24	HTLV2 ENV, HTLV2 FAPON	HTLV1 E1+HTLV1 E701
POS VER	36	36	37	36	36	9	26
NEG VER	260	140	267	156	288	146	15
POS FAL	64	184	57	168	36	210	146
NEG FAL	1	1	0	1	1	0	2
	361	361	361	361	361	365	189
SENSIBILIDADE	97%	97%	100%	97%	97%	100%	93%
ESPECIFICIDADE	80.2%	43.2%	82.4%	48.1%	88.9%	41.0%	9.3%
TAXA DE FALSOS POSITIVOS	19.75%	56.79%	17.59%	51.85%	11.11%	58.99%	90.68%
ACURÁCIA	82%	49%	84%	53%	90%	42%	22%
PRECISÃO	36%	16%	39%	18%	50%	4%	15%
VALOR PREDITIVO NEGATIVO	100%	99%	100%	99%	100%	100%	88%

	HTLV1 E1+TESTE5	HTLV1 E1+HTLV1 GP46	HTLV1 E1, HTLV1 P24	HTLV1 E1, HTLV2 FAPON	4XTEST E5	4XHTLV1 GP46	HTLV1 E701, HTLV1 P24
POS VER	25	27	26	36	26	27	26
NEG VER	142	31	107	146	22	28	28
POS FAL	19	130	54	182	139	133	133
NEG FAL	3	1	2	1	2	1	2
	189	189	189	365	189	189	189
SENSIBILIDADE	89%	96%	93%	97%	93%	96%	93%
ESPECIFICIDADE	88.2%	19.3%	66.5%	44.5%	13.7%	17.4%	17.4%
TAXA DE FALSOS POSITIVOS	11.80%	80.75%	33.54%	55.49%	86.34%	82.61%	82.61%
ACURÁCIA	88%	31%	70%	50%	25%	29%	29%
PRECISÃO	57%	17%	33%	17%	16%	17%	16%
VALOR PREDITIVO NEGATIVO	98%	97%	98%	99%	92%	97%	93%

	HTLV1 E701, HTLV2 FAPON	HTLV1 GP21, HTLV1 GP46	HTLV1 GP21, HTLV1 P24	HTLV1 GP21, HTLV2 FAPON	HTLV1 GP46, HTLV1 P24	HTLV1 GP46, HTLV2 FAPON	HTLV1 P24, HTLV2 FAPON
POS VER	36	28	25	35	27	36	36
NEG VER	159	40	105	153	40	159	105
POS FAL	169	117	54	175	117	169	223
NEG FAL	1	2	3	2	1	1	1
	365	187	187	365	185	365	365
SENSIBILIDADE	97%	93%	89%	95%	96%	97%	97%
ESPECIFICIDADE	48.5%	25.5%	66.0%	46.6%	25.5%	48.5%	32.0%
TAXA DE FALSOS POSITIVOS	51.52%	74.52%	33.96%	53.35%	74.52%	51.52%	67.99%
ACURÁCIA	53%	36%	70%	52%	36%	53%	39%
PRECISÃO	18%	19%	32%	17%	19%	18%	14%
VALOR PREDITIVO NEGATIVO	99%	95%	97%	99%	98%	99%	99%

4.11 ACOPLAMENTOS DOS ANTÍGENOS PARA SIFILIS

4.11.1 Acoplamentos Sífilis P17

A partir da análise dos resultados Tabela 4.48 as condições apresentaram os melhores resultados, pois apresentaram os maiores valores de AUC, assim como, de sensibilidade/especificidade. Foi escolhido o 50 μ g/ml em CARBO como a melhor condição de acoplamento para o multiteste

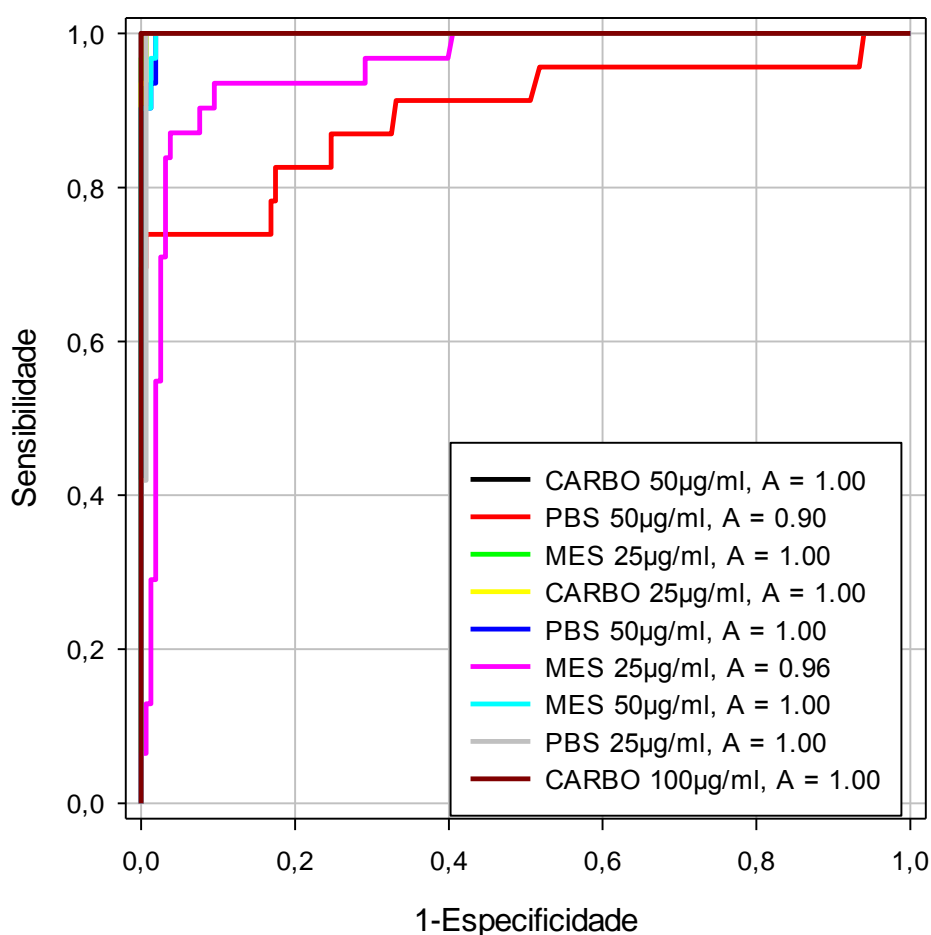


FIGURA 4.39 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO SÍFILIS P17 DAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.

Quando comparamos as curvas ROC e suas AUC dos resultados obtidos na Figura 4.39 observa-se a diferença entre estas mostrando que realmente a condição escolhida tem um desempenho melhor que as outras.

4.11.2 Sífilis P47

A partir da análise dos resultados Tabela 4.49 as condições apresentaram os melhores resultados, pois apresentaram os maiores valores de AUC, assim como, de sensibilidade/especificidade. Foi escolhido o 50 $\mu\text{g/ml}$ em MES como a melhor condição de acoplamento para o multiteste. Quando comparamos as curvas ROC e suas AUC dos resultados obtidos na observa-se a diferença entre estas mostrando que realmente a condição escolhida tem um desempenho melhor que as outras.

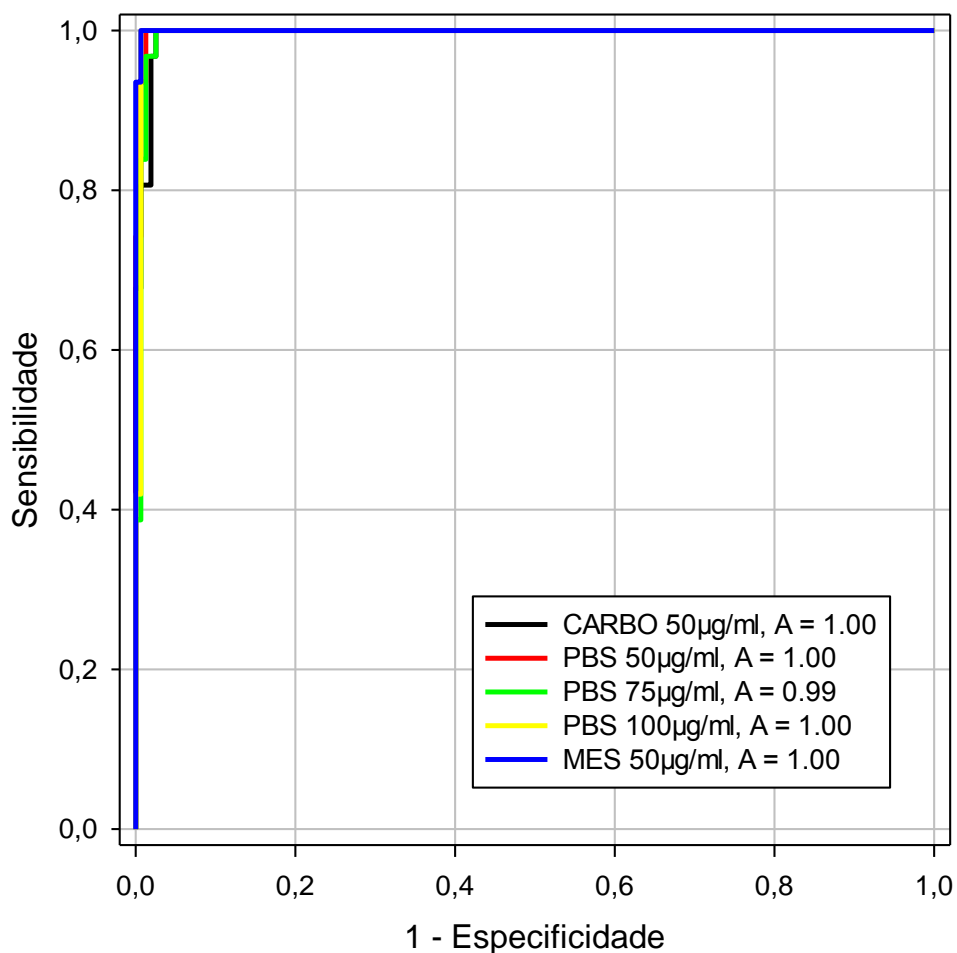


FIGURA 4.40 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO SÍFILIS P47 DAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.

TABELA 4.49 - ACOPLAMENTOS SÍFILIS P47

DOENÇA	SÍFILIS	SÍFILIS	SÍFILIS	SÍFILIS	SÍFILIS
ANTÍGENO	P47	P47	P47	P47	P47
TAMPÃO	CARBO	PBS	PBS	PBS	MES
[ACOPLAMENTO]	50	50	75	100	50
CUTOFF	897	1607	1976	2534	973
NEGATIVOS	158	158	158	158	158
NEGATIVOS VERDADEIROS	154	156	154	157	157
POSITIVOS	31	31	31	31	31
POSITIVOS VERDADEIROS	31	31	31	31	31
FALSO POSITIVOS	4	2	4	1	1
SENSIBILIDADE	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
ESPECIFICIDADE	97.5%	98.7%	97.5%	99.4%	99.4%
TOTAL AMOSTRAS	189	189	189	189	189
ÁREA DA CURVA ROC	0.9953	0.9980	0.9947	0.9963	0.9996
DESVIO PADRÃO	0.0031	0.0019	0.00419	0.003748	0.0005667
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	0.9892 ATÉ 1.001	0.9942 ATÉ 1.002	0.9865 ATÉ 1.004	0.9890 ATÉ 1.004	0.9985 ATÉ 1.001
VALOR DE P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

4.11.3 Sífilis TPMA

A partir da análise dos resultados Tabela 4.50 as condições apresentaram os melhores resultados, pois apresentaram os maiores valores de AUC, assim como, de sensibilidade/especificidade. Foi escolhido o 100 µg/ml em MES como a melhor condição de acoplamento para o multiteste. Quando comparamos as curvas ROC e suas AUC dos resultados obtidos na observa-se a diferença entre estas mostrando que realmente a condição escolhida tem um desempenho melhor que as outras.

TABELA 4.50 - ACOPLAMENTOS SÍFILIS TPMA

DOENÇA	SÍFILIS	SÍFILIS
ANTÍGENO	TPMA	TPMA
TAMPÃO	MES	MES
[ACOPLAMENTO]	50	100
CUTOFF	237	649

NEGATIVOS	161	158
NEGATIVOS VERDADEIROS	157	157
POSITIVOS	31	31
POSITIVOS VERDADEIROS	30	31
FALSO POSITIVOS	4	1
SENSIBILIDADE	96.8%	100.0%
ESPECIFICIDADE	97.5%	99.4%
TOTAL AMOSTRAS	189	189
ÁREA DA CURVA ROC	0.9766	0.9996
DESVIO PADRÃO	0.0221	0.0006
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	0.9224 ATÉ 1.020	0.9985 ATÉ 1.001
VALOR DE P	< 0.0001	< 0.0001

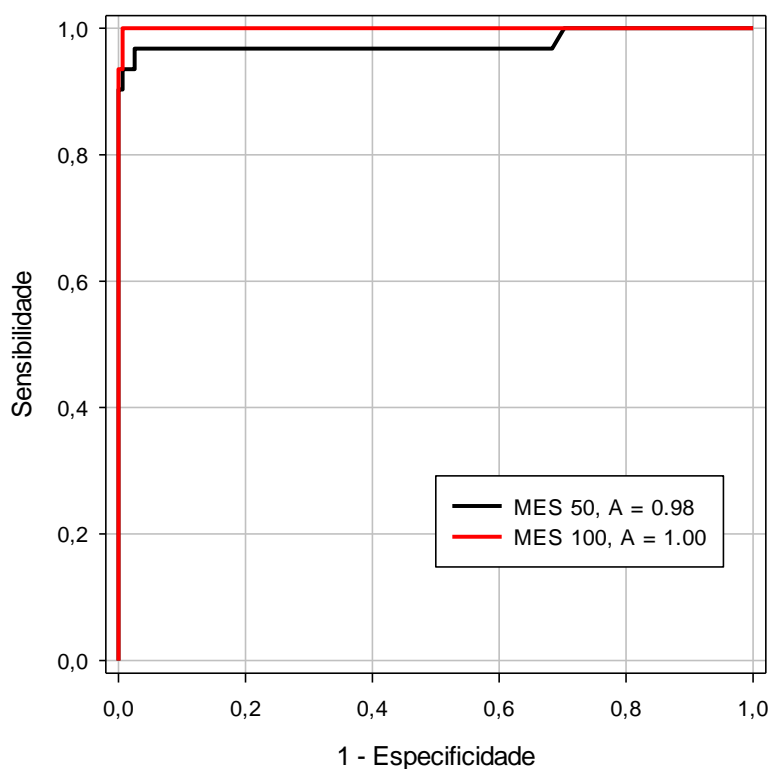


FIGURA 4.41 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO SÍFILIS TMPA DAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.

4.11.4 Comparação entre as melhores condições dos antígenos de Sífilis

A fim de determinar o melhor antígeno ou a combinação de antígenos para o se obter o melhor teste, os resultados dos acoplamentos foram comparados entre si através da comparação das áreas das curvas ROC e teste de Combinação Antígeno + Antígeno.

TABELA 4.51 MELHORES CONDIÇÕES DE ACOPLAMENTO DOS ANTÍGENOS PARA SÍFILIS

DOENÇA	SÍFILIS	SÍFILIS	SÍFILIS
ANTÍGENO	P17	P47	TPMA
TAMPÃO	CARBO	MES	MES
[ACOPLAMENTO]	50	50	100
CUTOFF	1044	937	649
NEGATIVOS	158	158	158
NEGATIVOS VERDADEIROS	158	157	157
POSITIVOS	31	31	31
POSITIVOS VERDADEIROS	31	31	31
FALSO POSITIVOS	0	1	1
TOTAL AMOSTRAS	189	189	189
SENSIBILIDADE	100.0%	100.00%	100.00%
ESPECIFICIDADE	100.0%	99.40%	99.40%
TAXA DE FALSO POSITIVOS	0.00%	1%	1%
ACURÁCIA	100%	99%	99%
PRECISÃO	100%	97%	97%
VALOR PREDITIVO NEGATIVO	100%	100%	100%
ÁREA DA CURVA ROC	1.000	0.9996	0.9996
DESVIO PADRÃO	0.000	0.0006	0.0006
INTERVALO DE CONFIANÇA 95%	1.000 ATÉ 1.00	0.9985 ATÉ 1.001	0.9985 ATÉ 1.001
VALOR DE P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

A comparação entre os resultados das curvas ROC dos antígenos de Sífilis (Tabela 4.53) apresentou uma diferença de área de resultados estatisticamente significativa com todos os valores de $P > 1$, exceto P47+TPMA que tem curvas idênticas.

TABELA 4.52 COMPARAÇÃO ENTRE AS CURVAS ROC

	P17, P47	P17, TPMA	P47, TPMA
DIFERENÇA DE ÁREA	0.0004	0.0004	0.000
ERRO PADRÃO	0.0006	0.0006	DATA IDENTICAL

INTERVALO DE CONFIANÇA	-0.000702 ATÉ	-0.000702 ATÉ
95%	0.001519	0.00
ESTATÍSTICA Z	0.721	7.205
VALOR DE P	0.471	4.712

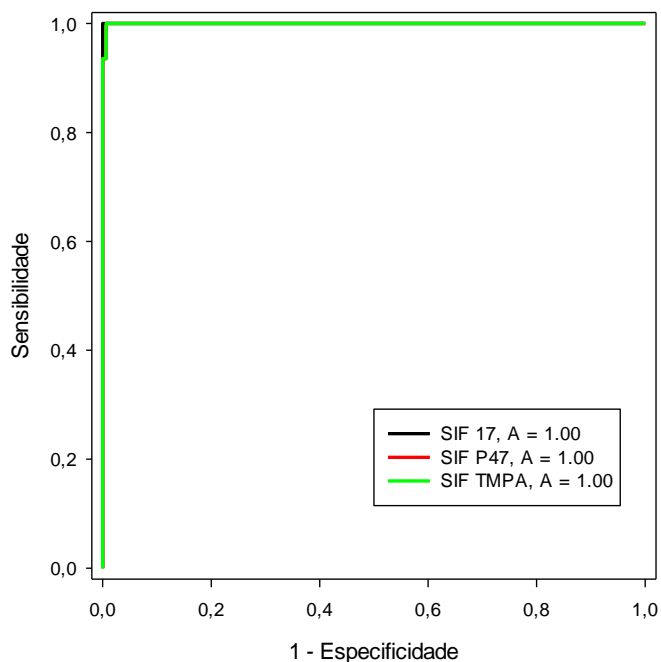


FIGURA 4.42 - GRÁFICO DA CURVA ROC DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DOS ACOPLAMENTOS DO ANTÍGENO SÍFILIS P47 DAS DIFERENTES CONDIÇÕES AVALIADAS; (A) CORRESPONDE A ÁREA DO ABAIXO DA CURVA ROC CALCULADA PELA ANÁLISE DA CURVA ROC.

A análise de Combinação Antígeno + Antígeno Figura 4.43 onde os resultados de sensibilidade/especificidade e acurácia/precisão mostra que a combinação não melhora o resultado do teste, os antígenos individuais tem performance no teste melhor que a combinação destes.

TABELA 4.53 ANÁLISE DE COMBINAÇÃO ANTÍGENO + ANTÍGENO

	P17	P17, P47	P17, TPMA	P47	P47, TPMA	TPMA
SENSIBILIDADE	100%	100%	100%	100.0%	100%	100%
ESPECIFICIDADE	100.0%	99.4%	99.4%	99.4%	99.4%	99%
TAXA DE FALSOS POSITIVOS	0.00%	0.63%	0.63%	0.63%	0.63%	1%
ACURÁCIA	100%	99%	99%	99%	99%	99%

PRECISÃO	100%	97%	97%	100%	97%	100%
VALOR PREDITIVO NEGATIVO	100%	100%	100%	100%	100%	100%

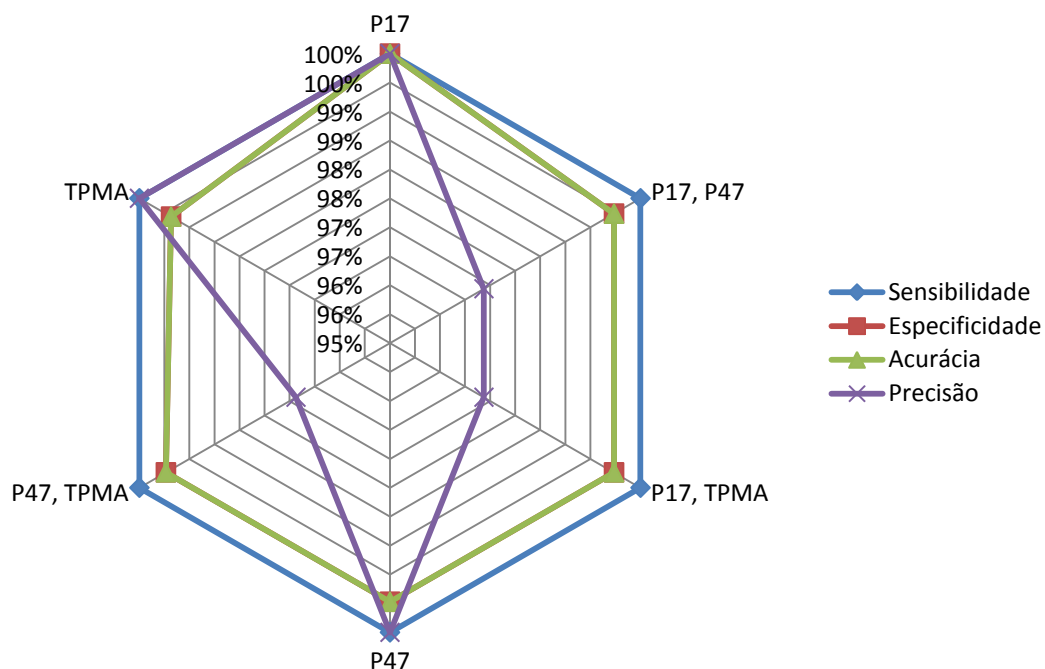


FIGURA 4.43 - ANÁLISE DE COMBINAÇÃO ANTÍGENO + ANTÍGENO DE SÍFILIS COM OS PARÂMETROS UTILIZADOS PARA AVALIAR A COMBINAÇÃO DOS ANTÍGENOS

4.12 MULTITESTE

Após avaliação individual dos antígenos de item foram selecionados os antígenos para compor o multiteste

- Chagas , Multiantígeno 100µg/ml PBS;
- Chagas - Lisado 100µg/ml Carbo
- HBV Core Meridian 25µg/ml PBS,
- HBV Core Prospec 25µg/ml Carbo;
- HCV NS3 250 µg/ml Carbo,
- HCV Multi-antígeno 20µg/ml Carbo;

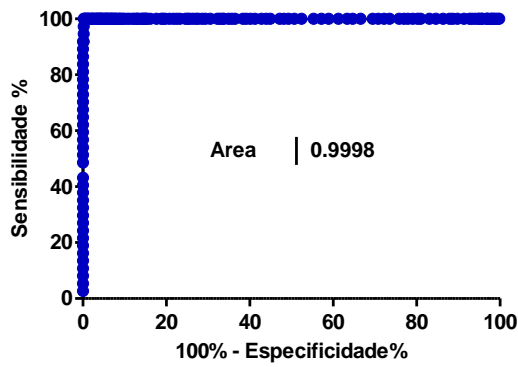
HIV12 301 (gp41+gp120+gp36 antígeno quimérico) 25µg/ml Carbo,
HIV122 302 (gp41+gp120+gp36 antígeno quimérico) 25µg/ml PBS,
HTLV1 gp21+46 25 µg/ml Carbo,
HTLV1 gp21 25µg/ml PBS
HTLV1 env 100µg/ml MES
HTLV2 gp21+gp46, 25µg/ml CARBO
Sífilis p17 250µg/ml, CARBo
Sífilis p47 100µg/ml PBS
Sífilis TPMA 100µg/ml MES
HBV AntiHBsAG 25µg/ml PBS
HIV Anti-P24 100µg/ml Carbo
Controle de Amostra Anti IgG 5 µg/ml PBS

Esses analitos foram acoplados nas condições em que apresentaram a maior sensibilidade durante avaliação individual. Os acoplamentos foram contados, e a mistura foi feita de modo que cada código da microesfera ficasse em condição de 50 microesferas/µl, ou 2.500 microesferas para cada 50 µl. Como foram utilizados 18 códigos havia um total de 650 microesferas/µl, sendo em cada poço da microplaca dispensados 32.500 microesferas totais.

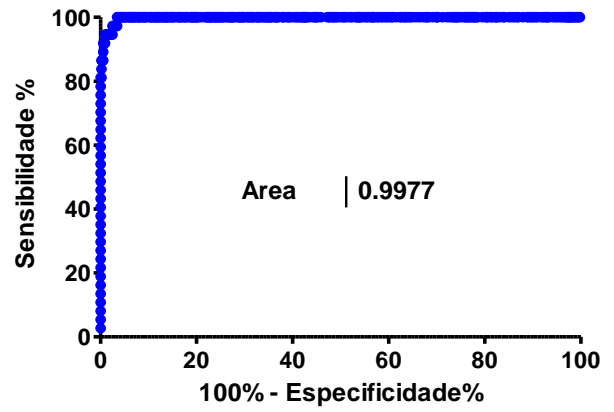
Os analitos foram testados contra todos os painéis, o Painel AEQ ampliado, todos os painéis de amostras comerciais e as negativas do Hemepar totalizando 558 amostras. Os resultados foram avaliados através da análise da curva ROC.

4.12.1 Resultados dos Antígenos Chagas utilizados no Multiteste

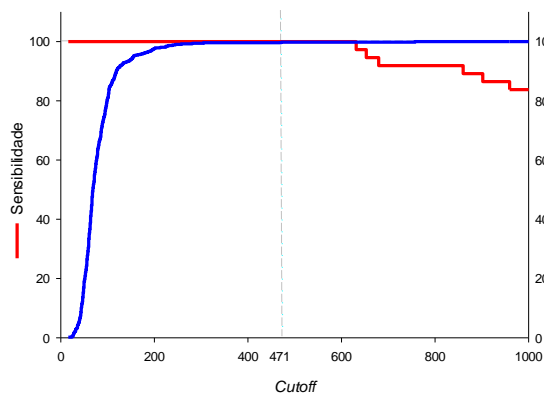
A1



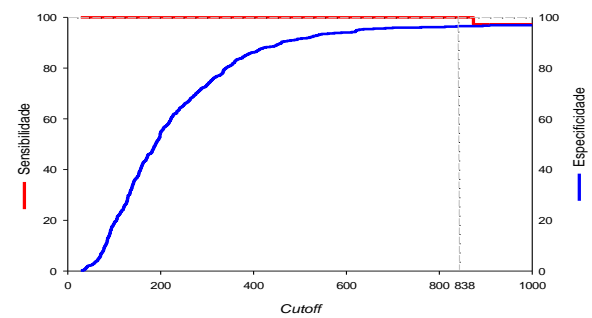
A2



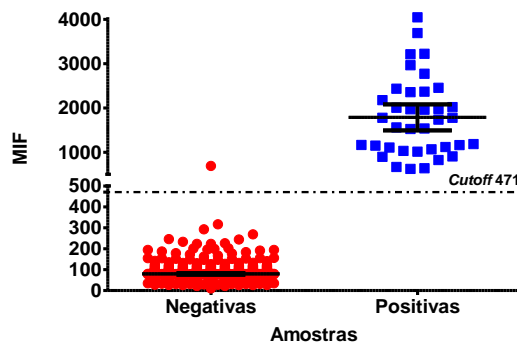
B1



B2



C1



C2

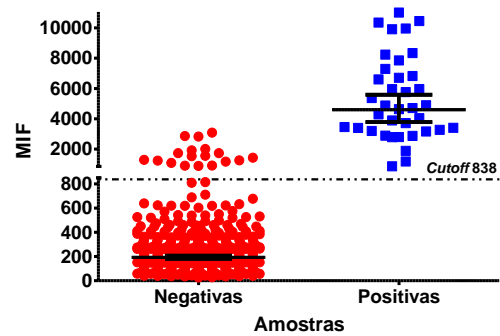


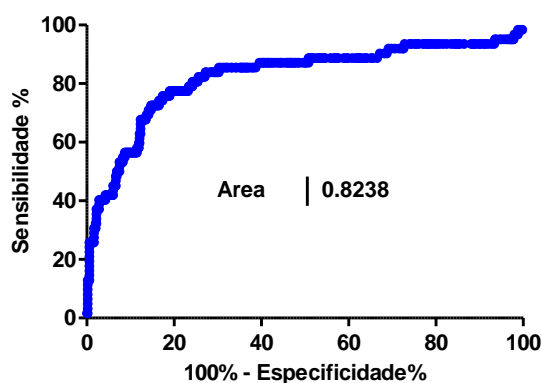
FIGURA 4.44 RESULTADOS DOS ANTÍGENOS CHAGAS UTILIZADOS NO MULTITESTE PARA O MULTIANTÍGENO DE CHAGAS A1) GRÁFICO DA ANÁLISE CURVA ROC COM UMA ÁREA ABAIXO DA CURVA DE 0,9998; B1) GRÁFICO SENSIBILIDADE X CUTOFF X ESPECIFICIDADE REPRESENTANDO O VALOR DE CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA CURVA ROC N=471 C1) SCATTER PLOT DAS MIF OBTIDAS DAS AMOSTRAS NEGATIVAS E POSITIVAS ANALISADAS E SUA RELAÇÃO COM O CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA ANÁLISE ROC MOSTRANDO O IC95% PARA O LISADO CHAGAS A2) GRÁFICO DA ANÁLISE CURVA ROC COM UMA ÁREA ABAIXO DA CURVA DE 0,9977; B2) GRÁFICO SENSIBILIDADE X CUTOFF X ESPECIFICIDADE REPRESENTANDO O VALOR DE CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA CURVA ROC N=838 C2) SCATTER PLOT DAS MIF OBTIDAS DAS AMOSTRAS NEGATIVAS E POSITIVAS ANALISADAS E SUA RELAÇÃO COM O CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA ANÁLISE ROC MOSTRANDO O IC95%

O acoplamento do Multi-antígeno de chagas havia apresentado um valor de AUC de 0,9998, 100% de sensibilidade e 99,4% especificidade. No formato multiteste o antígeno mostrou o mesmo resultado onde apenas uma amostra negativa foi classificada como positiva.

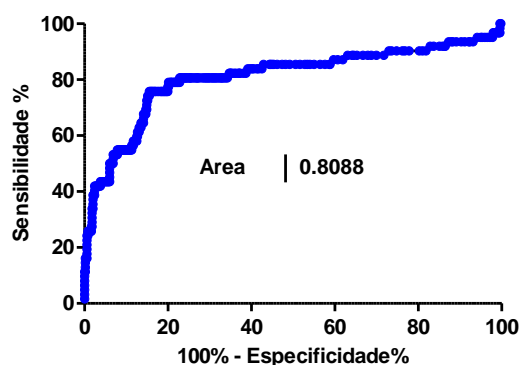
Já o lisado havia apresentado uma AUC de 1,000, 100% de sensibilidade e 100% de especificidade. Isso não se manteve com a expansão do número de amostras, principalmente as amostras negativas que se mostraram altamente reativas, aumentando o valor do cutoff, ao ponto do surgimento de inúmeros falso positivos. No multiteste o valor de AUC abaixo da curva caiu para 0,9977, a sensibilidade foi mantida mas a especificidade caiu 96,5%.

4.12.2 Resultados dos Antígenos HBV utilizados no Multiteste

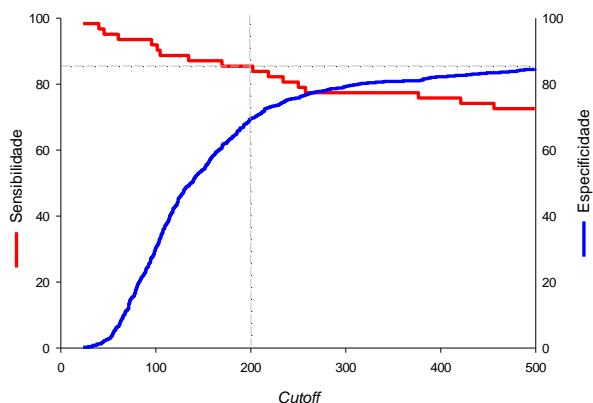
A1



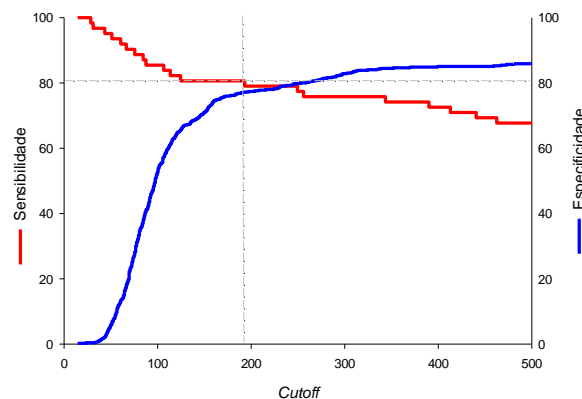
A2



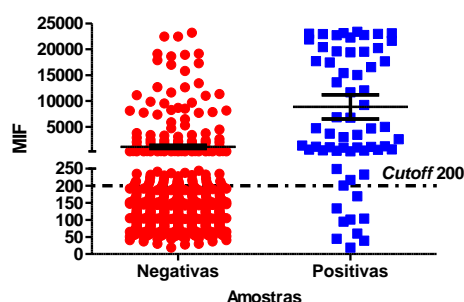
B1



B2



C1



C3

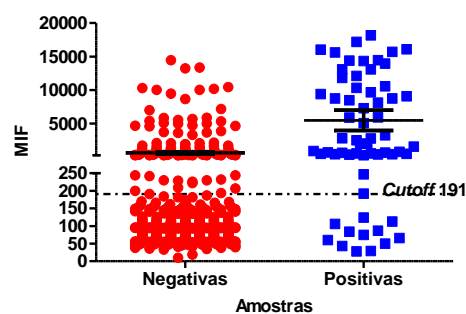


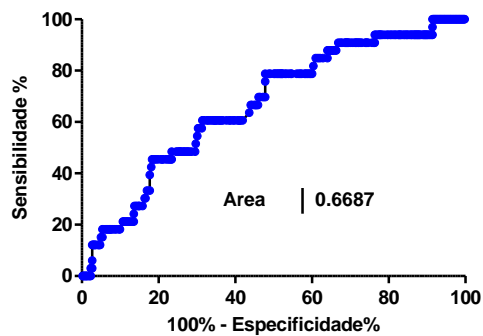
FIGURA 4.45 - RESULTADOS DOS ANTÍGENOS HBV UTILIZADOS NO MULTITESTE PARA O HBV CORE DELTA A1) GRÁFICO DA ANÁLISE CURVA ROC COM UMA ÁREA ABAIXO DA CURVA DE 0,8238; B1) GRÁFICO SENSIBILIDADE X CUTOFF X ESPECIFICIDADE REPRESENTANDO O VALOR DE CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA CURVA ROC N=200 C1) SCATTER PLOT DAS MIF OBTIDAS DAS AMOSTRAS NEGATIVAS E POSITIVAS ANALISADAS E SUA RELAÇÃO COM O CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA ANÁLISE ROC MOSTRANDO O IC95% PARA HBV CORE A2) GRÁFICO DA ANÁLISE CURVA ROC COM UMA ÁREA ABAIXO DA CURVA DE 0,8088; B2) GRÁFICO SENSIBILIDADE X CUTOFF X ESPECIFICIDADE REPRESENTANDO O VALOR DE CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA CURVA ROC N=191 C2) SCATTER PLOT DAS MIF OBTIDAS DAS AMOSTRAS NEGATIVAS E POSITIVAS ANALISADAS E SUA RELAÇÃO COM O CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA ANÁLISE ROC MOSTRANDO O IC95% .

O acoplamento de HBV Core Delta havia apresentado um valor de AUC de 0,9805, 97% de sensibilidade e 88% especificidade. No formato multiteste este resultado não se manteve havendo uma queda nos valores de AUC para, 0.9238, 86% de sensibilidade e 70% de especificidade. Houve um grande aumento no número de falsos positivos e falso negativos mesmo em relação as mesmas amostras do painel originalmente testado.

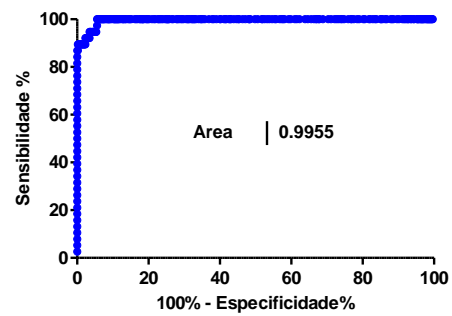
O acoplamento de HBV Core Meridian havia apresentado uma valor de AUC de 0,9969, 97% de sensibilidade e 85% especificidade. No formato multiteste este resultado não se manteve havendo uma queda nos valores de AUC para, 0.8238, 81% de Sensibilidade e 77% de especificidade. Houve um grande aumento no número de falsos positivos e falso negativos.

4.12.3 Resultados dos Antígenos HCV utilizados no Multiteste

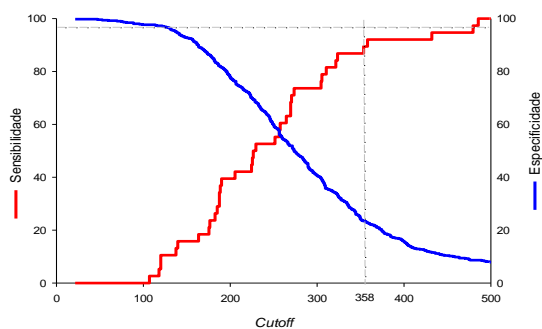
A1



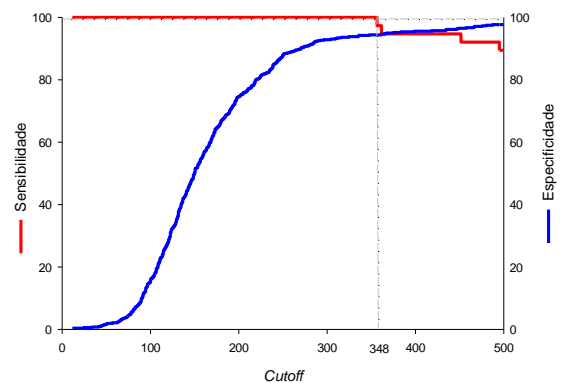
A2



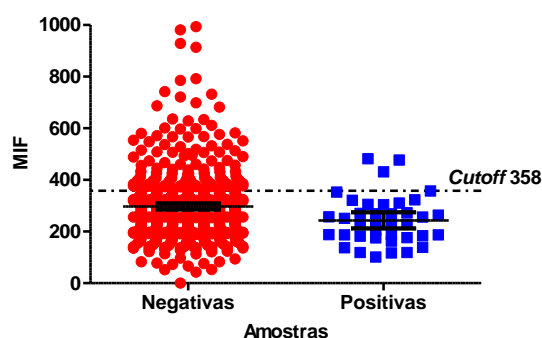
B1



B2



C1



C2

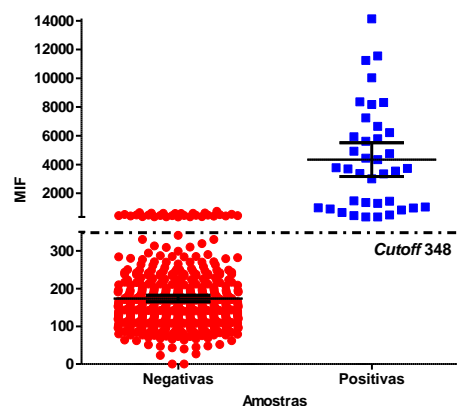


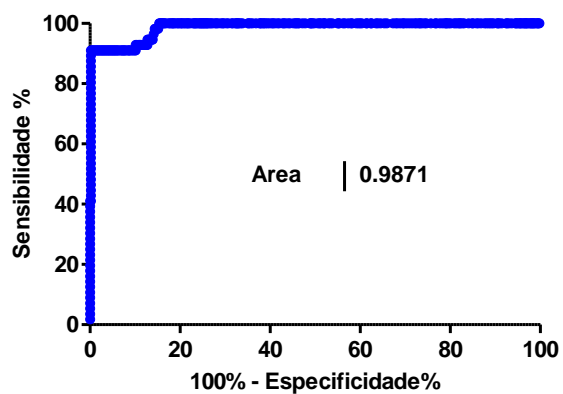
FIGURA 4.46 - RESULTADOS DOS ANTÍGENOS HCV UTILIZADOS NO MULTITESTE PARA O HCV NS3 A1) GRÁFICO DA ANÁLISE CURVA ROC COM UMA ÁREA ABAIXO DA CURVA DE 0.6687; B1) GRÁFICO SENSIBILIDADE X CUTOFF X ESPECIFICIDADE REPRESENTANDO O VALOR DE CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA CURVA ROC N=358 C1) SCATTER PLOT DAS MIF OBTIDAS DAS AMOSTRAS NEGATIVAS E POSITIVAS ANALISADAS E SUA RELAÇÃO COM O CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA ANÁLISE ROC MOSTRANDO O IC95% PARA HCV MULTIANTÍGENO A2) GRÁFICO DA ANÁLISE CURVA ROC COM UMA ÁREA ABAIXO DA CURVA DE 0.9955; B2) GRÁFICO SENSIBILIDADE X CUTOFF X ESPECIFICIDADE REPRESENTANDO O VALOR DE CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA CURVA ROC N=348 C2) SCATTER PLOT DAS MIF OBTIDAS DAS AMOSTRAS NEGATIVAS E POSITIVAS ANALISADAS E SUA RELAÇÃO COM O CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA ANÁLISE ROC MOSTRANDO O IC95%

O antígeno NS3 HCV havia apresentado uma AUC de 0.9339, 96% de sensibilidade e 75% de especificidade. Isso não se manteve com a expansão do número de amostras, principalmente as amostras negativas que se mostraram altamente reativas, aumentando o valor do *cutoff*, ao ponto do surgimento de inúmeros falso positivos e falso negativos. No multiteste o valor de AUC abaixo da curva caiu para 0.6687, 94% de sensibilidade e 23% de especificidade. Este antígeno não funcionou em formato multiteste.

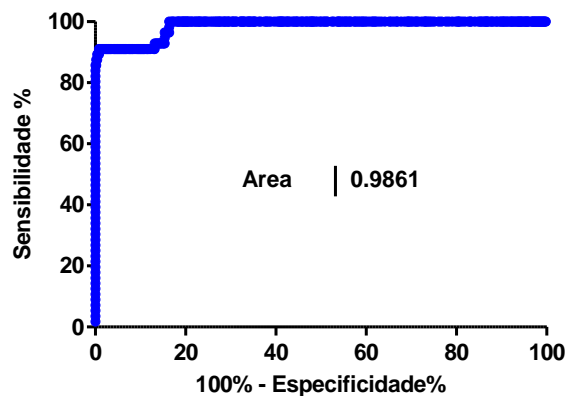
O acoplamento do HCV Multiantígeno havia apresentado uma valor de AUC de 0.9955, 100% de sensibilidade e 95% especificidade. No formato multiteste o antígeno mostrou o mesmo resultado separando as duas populações de antígenos.

4.12.4 Resultados dos Antígenos HIV utilizados no Multiteste

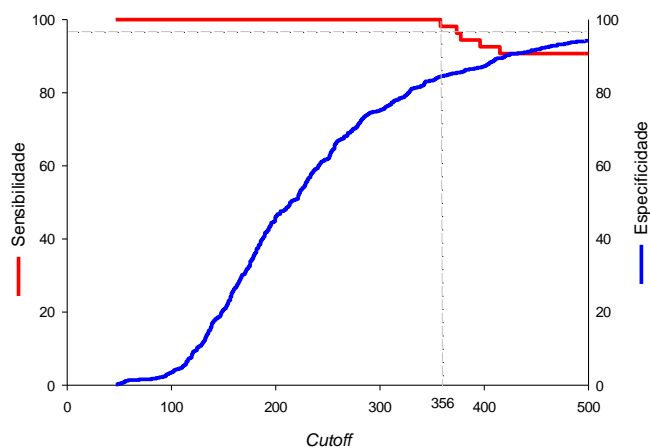
A1



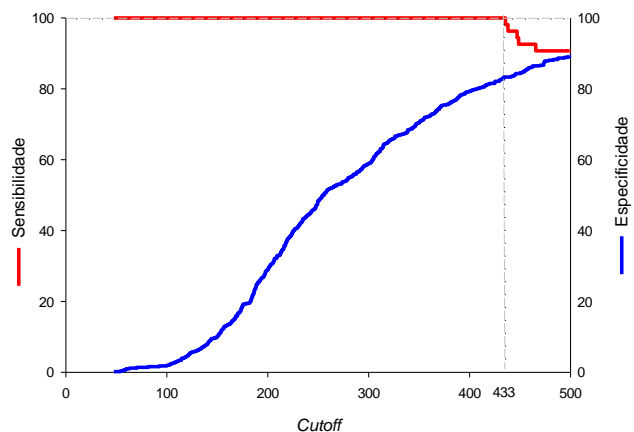
A2



B1



B2



C1

C2

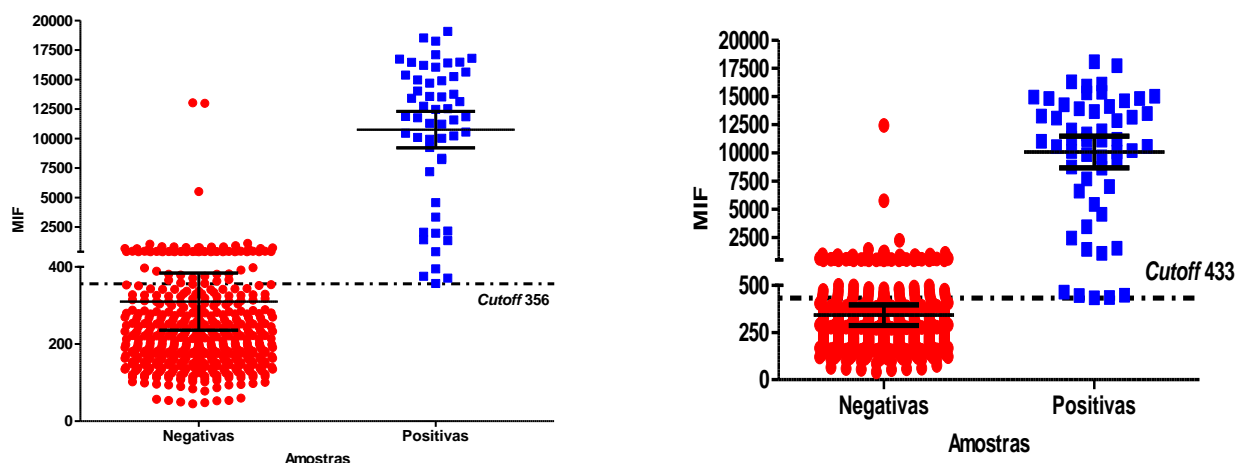


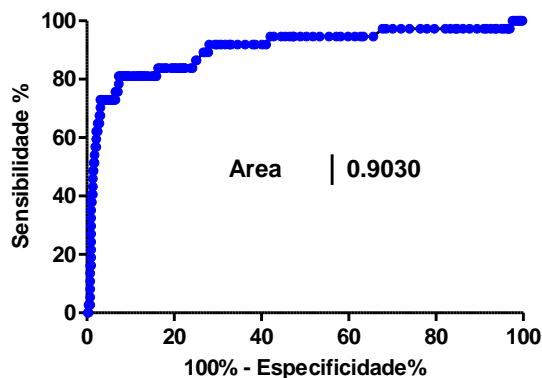
FIGURA 4.47 - RESULTADOS DOS ANTÍGENOS HIV UTILIZADOS NO MULTITESTE PARA O HIV12 A1) GRÁFICO DA ANÁLISE CURVA ROC COM UMA ÁREA ABAIXO DA CURVA DE 0.9871; B1) GRÁFICO SENSIBILIDADE X CUTOFF X ESPECIFICIDADE REPRESENTANDO O VALOR DE CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA CURVA ROC N=356 C1) SCATTER PLOT DAS MIF OBTIDAS DAS AMOSTRAS NEGATIVAS E POSITIVAS ANALISADAS E SUA RELAÇÃO COM O CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA ANÁLISE ROC MOSTRANDO O IC95% PARA HIV122 A2) GRÁFICO DA ANÁLISE CURVA ROC COM UMA ÁREA ABAIXO DA CURVA DE 0.9861; B2) GRÁFICO SENSIBILIDADE X CUTOFF X ESPECIFICIDADE REPRESENTANDO O VALOR DE CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA CURVA ROC N=433 C2) SCATTER PLOT DAS MIF OBTIDAS DAS AMOSTRAS NEGATIVAS E POSITIVAS ANALISADAS E SUA RELAÇÃO COM O CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA ANÁLISE ROC MOSTRANDO O IC95%

O acoplamento de HIV12 havia apresentado um valor de AUC de 0.9796, 97% de sensibilidade e 98% especificidade. No formato multiteste este resultado se manteve havendo uma pequena queda nos valores de AUC para, 0.9871, 100% de Sensibilidade e 85% de especificidade. Houve um grande aumento no número de falsos positivos.

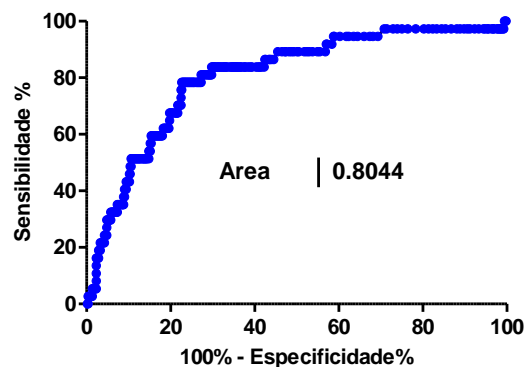
O acoplamento de HIV122 havia apresentado um valor de AUC de 0.9947, 100% de sensibilidade e 94% especificidade. No formato multiteste este resultado se manteve havendo uma pequena queda nos valores de AUC para, 0.9861, 100% de Sensibilidade e 84% de especificidade. Houve um grande aumento no número de falsos positivos

4.12.5 Resultados dos Antígenos HTLV utilizados no Multiteste

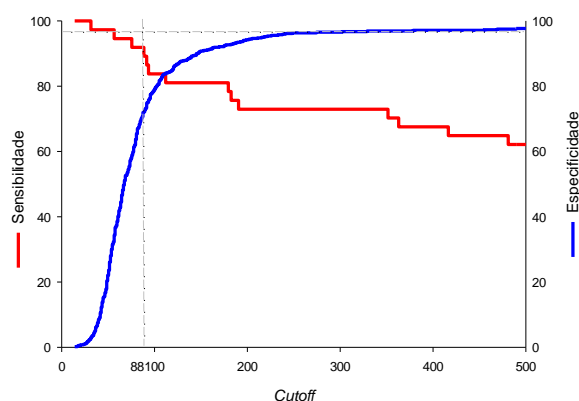
A1



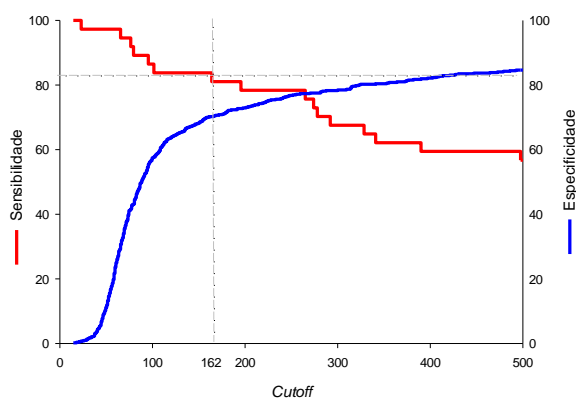
A2



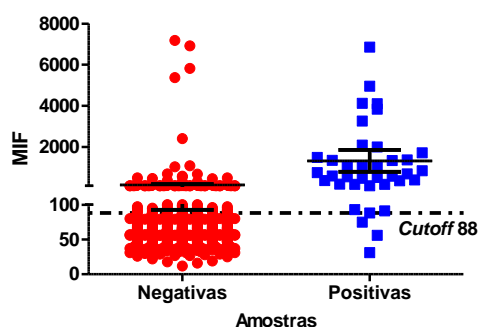
B1



B2



C1



C2

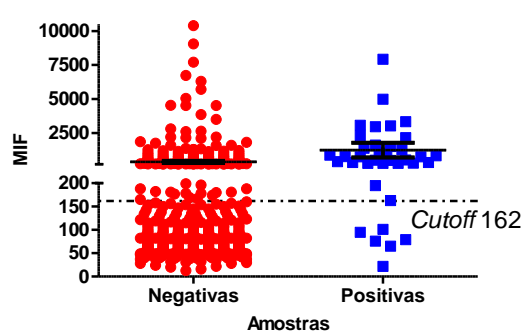


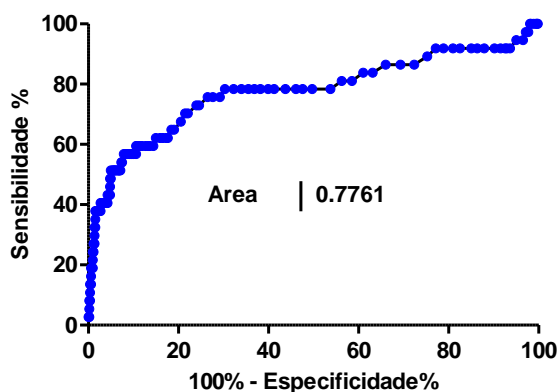
FIGURA 4.48 - RESULTADOS DOS ANTÍGENOS HCV UTILIZADOS NO MULTITESTE PARA O HTLV1 GP21+GP46 A1) GRÁFICO DA ANÁLISE CURVA ROC COM UMA ÁREA ABAIXO DA CURVA DE 0.9030; B1) GRÁFICO SENSIBILIDADE X CUTOFF X ESPECIFICIDADE REPRESENTANDO O VALOR DE CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA CURVA ROC N=88 C1) SCATTER PLOT DAS MIF OBTIDAS DAS AMOSTRAS NEGATIVAS E POSITIVAS ANALISADAS E SUA RELAÇÃO COM O CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA ANÁLISE ROC MOSTRANDO O IC95% PARA HTLV ENV A2) GRÁFICO DA ANÁLISE

CURVA ROC COM UMA ÁREA ABAIXO DA CURVA DE 0.8044; B2) GRÁFICO SENSIBILIDADE X CUTOFF X ESPECIFICIDADE REPRESENTANDO O VALOR DE CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA CURVA ROC N=162 C2) SCATTER PLOT DAS MIF OBTIDAS DAS AMOSTRAS NEGATIVAS E POSITIVAS ANALISADAS E SUA RELAÇÃO COM O CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA ANÁLISE ROC MOSTRANDO O IC95%

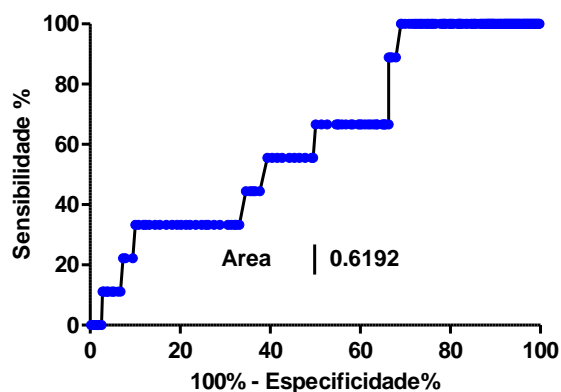
O acoplamento de HTLV1 GP21+GP46 havia apresentado uma valor de AUC de 0.970, 96% de sensibilidade e 92% especificidade. No formato multíteste este resultado se manteve havendo uma pequena queda nos valores de AUC para, 0.9030, 92% de Sensibilidade e 72% de especificidade. Houve um grande aumento no número de falsos positivos.

O acoplamento de HTLV ENV havia apresentado uma valor de AUC de 0.991, 100% de sensibilidade e 91% especificidade. No formato multíteste este resultado se manteve havendo uma pequena queda nos valores de AUC para, 0.8044, 84% de Sensibilidade e 70% de especificidade. Houve um grande aumento no número de falsos positivos.

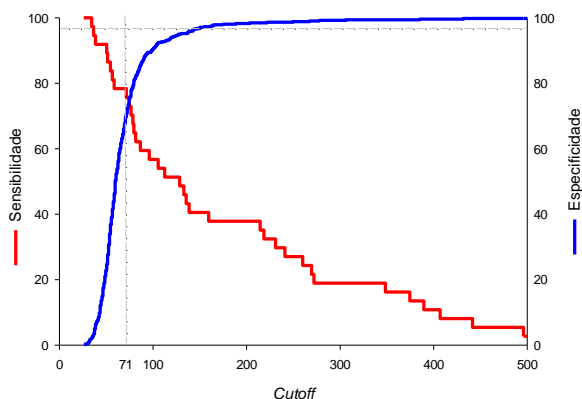
A1



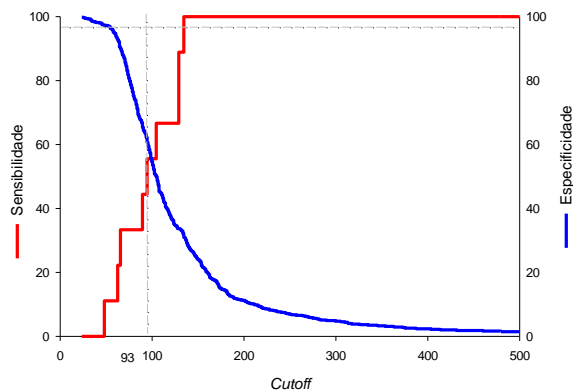
A2



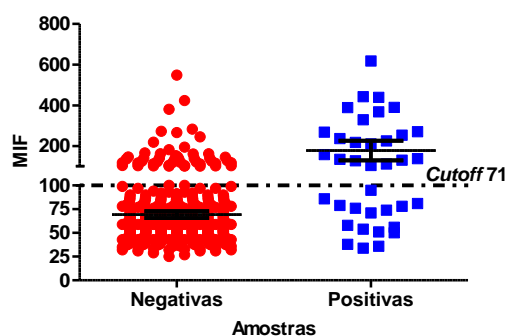
B1



B2



C1



C2

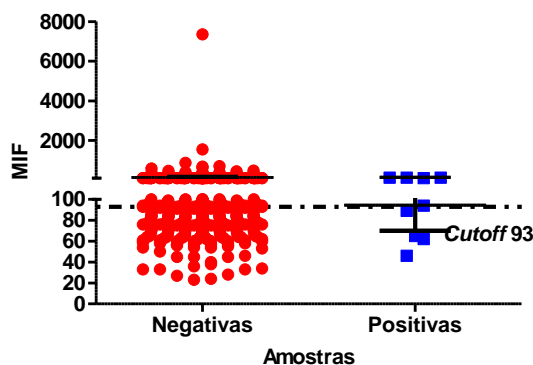


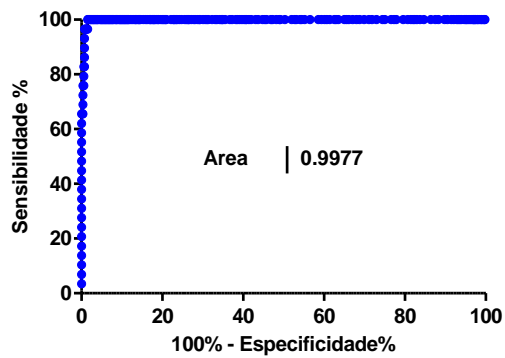
FIGURA 4.49 - RESULTADOS DOS ANTÍGENOS HTLV UTILIZADOS NO MULTITESTE PARA O HTLV GP21 A1) GRÁFICO DA ANÁLISE CURVA ROC COM UMA ÁREA ABAIXO DA CURVA DE 0.7761; B1) GRÁFICO SENSIBILIDADE X CUTOFF X ESPECIFICIDADE REPRESENTANDO O VALOR DE CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA CURVA ROC N=71 C1) SCATTER PLOT DAS MIF OBTIDAS DAS AMOSTRAS NEGATIVAS E POSITIVAS ANALISADAS E SUA RELAÇÃO COM O CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA ANÁLISE ROC MOSTRANDO O IC95% PARA HTLV GP21+GP46 A2) GRÁFICO DA ANÁLISE CURVA ROC COM UMA ÁREA ABAIXO DA CURVA DE 0.6192; B2) GRÁFICO SENSIBILIDADE X CUTOFF X ESPECIFICIDADE REPRESENTANDO O VALOR DE CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA CURVA ROC N=93 C2) SCATTER PLOT DAS MIF OBTIDAS DAS AMOSTRAS NEGATIVAS E POSITIVAS ANALISADAS E SUA RELAÇÃO COM O CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA ANÁLISE ROC MOSTRANDO O IC95%

O acoplamento de HTLV GP21 havia apresentado uma valor de AUC de 0.939, 93% de sensibilidade e 96% especificidade. No formato multiteste este resultado se manteve havendo uma queda nos valores de AUC para, 0.7761, 76% de Sensibilidade e 71% de especificidade. Houve um grande aumento no número de falsos positivos.

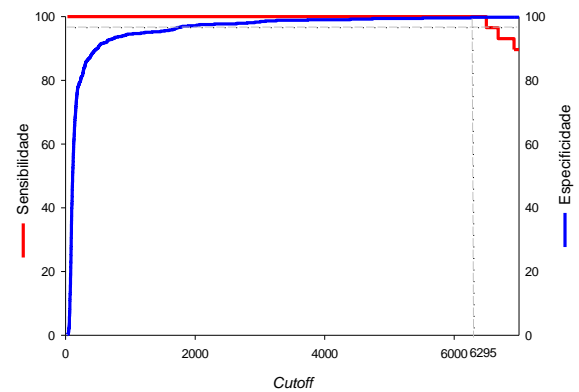
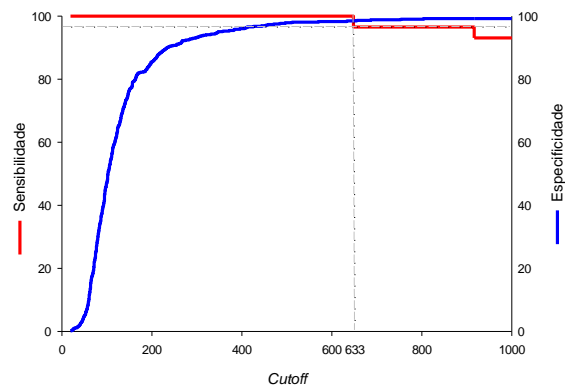
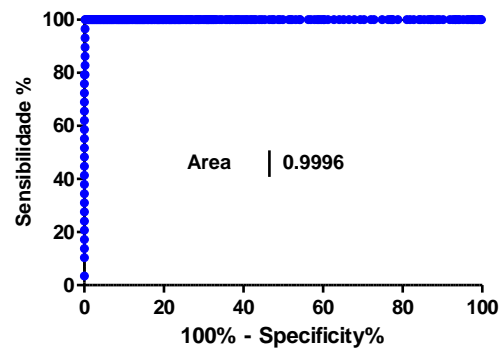
O acoplamento de HTLV2 GP21+GP46 havia apresentado um valor de AUC de 0.911, 100% de sensibilidade e 53% especificidade. No formato multiteste este resultado se manteve havendo uma queda nos valores de AUC para, 0.6192, 44% de Sensibilidade e 63% de especificidade. Houve um grande aumento no número de falsos positivos.

4.12.6 Resultados dos Antígenos Sífilis utilizados no Multiteste

A1



A2



C

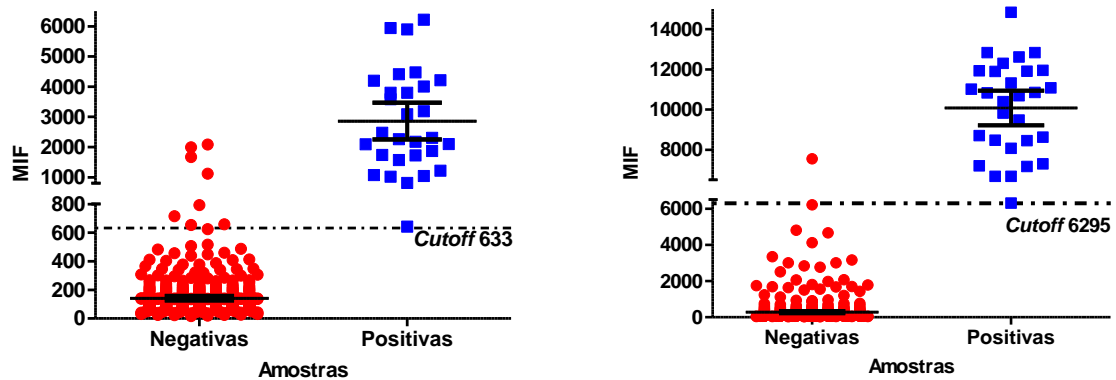
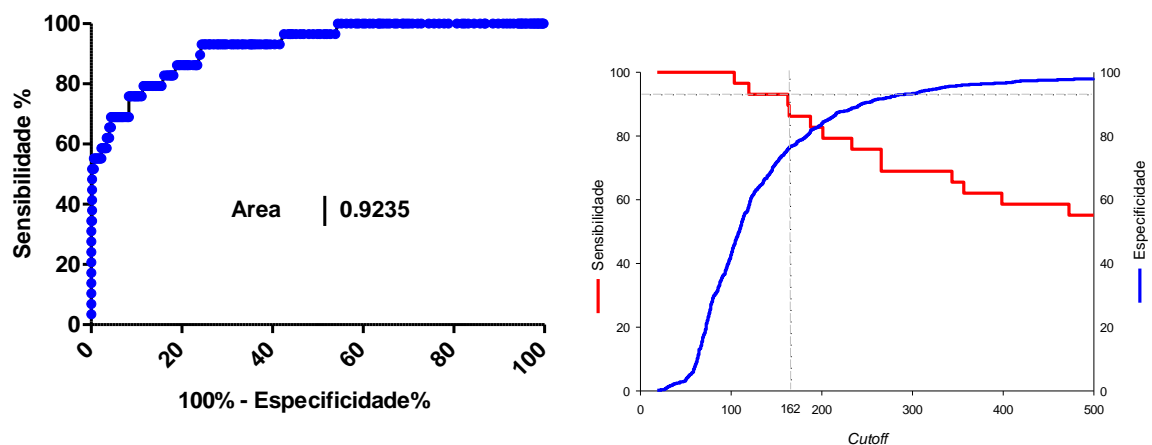


FIGURA 4.50 - RESULTADOS DOS ANTÍGENOS SÍFILIS UTILIZADOS NO MULTITESTE PARA A SÍFILIS P17 A1) GRÁFICO DA ANÁLISE CURVA ROC COM UMA ÁREA ABAIXO DA CURVA DE 0.9977; B1) GRÁFICO SENSIBILIDADE X CUTOFF X ESPECIFICIDADE REPRESENTANDO O VALOR DE CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA CURVA ROC N=633 C1) SCATTER PLOT DAS MIF OBTIDAS DAS AMOSTRAS NEGATIVAS E POSITIVAS ANALISADAS E SUA RELAÇÃO COM O CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA ANÁLISE ROC MOSTRANDO O IC95% PARA SÍFILIS P47 A2) GRÁFICO DA ANÁLISE CURVA ROC COM UMA ÁREA ABAIXO DA CURVA DE 0.9996; B2) GRÁFICO SENSIBILIDADE X CUTOFF X ESPECIFICIDADE REPRESENTANDO O VALOR DE CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA CURVA ROC N=6295 C2) SCATTER PLOT DAS MIF OBTIDAS DAS AMOSTRAS NEGATIVAS E POSITIVAS ANALISADAS E SUA RELAÇÃO COM O CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA ANÁLISE ROC MOSTRANDO O IC95%

A



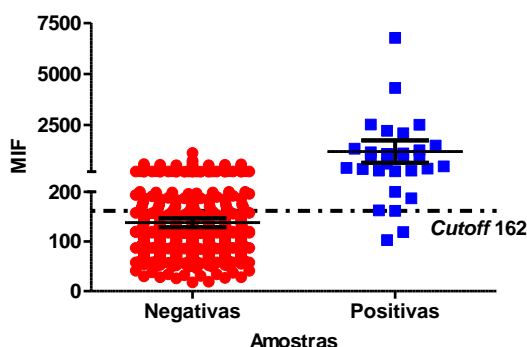


FIGURA 4.51 - RESULTADOS DOS ANTÍGENOS SÍFILIS UTILIZADOS NO MULTITESTE PARA O TPMA A1) GRÁFICO DA ANÁLISE CURVA ROC COM UMA ÁREA ABAIXO DA CURVA DE 0.9235; B1) GRÁFICO SENSIBILIDADE X CUTOFF X ESPECIFICIDADE REPRESENTANDO O VALOR DE CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA CURVA ROC N=162 C1) SCATTER PLOT DAS MIF OBTIDAS DAS AMOSTRAS NEGATIVAS E POSITIVAS ANALISADAS E SUA RELAÇÃO COM O CUTOFF OBTIDO ATRAVÉS DA ANÁLISE ROC MOSTRANDO O IC95%

O acoplamento de Sífilis P17 havia apresentado um valor de AUC de 1.000, 100% de sensibilidade e 100% especificidade. No formato multiteste este resultado não se manteve havendo uma queda nos valores de AUC para, 0.9977, 100% de Sensibilidade e 99% de especificidade. Houve um grande aumento no número de falsos positivos e falso negativos.

O acoplamento de Sífilis P47 havia apresentado um valor de AUC de 0,9969, 100% de sensibilidade e 97% especificidade. No formato multiteste este resultado não se manteve havendo uma queda nos valores de AUC para, 0.9996, 100% de Sensibilidade e 99,8% de especificidade. Houve um grande aumento no número de falsos positivos e falso negativos.

O acoplamento de Sífilis TPMA havia apresentado um valor de AUC de 0,9969, 100% de sensibilidade e 97% especificidade. No formato multiteste este resultado não se manteve havendo uma queda nos valores de AUC para, 0.9235, 93% de sensibilidade e 75% de especificidade. Houve um grande aumento no número de falsos positivos e falso negativos.

5 DISCUSSÃO

O projeto como um todo caminhou dentro do cronograma determinado, apesar dos diversos atrasos devido as importações dos antígenos/anticorpos, e materiais necessários ao desenvolvimento do projeto como anticorpos secundário e microseferas.

Com o aumento da experiência na execução do ensaio os testes se tornaram mais proficientes e a habilidade de determinar a performance dos antígenos e anticorpos foi se tornando mais precisa.

Ocorreram três mudanças que tiveram um grande impacto positivo no desenvolvimento do ensaio, inicialmente foi o treinamento na nova tecnologia. Isso nos permitiu perceber o que estava sendo feito de forma correta ou equivocada e avançar com mais consistência no desenvolvimento do projeto. A partir disso a confiança no trabalho como um todo aumentou.

Esta nos permitiu juntamente com um melhor conhecimento técnico desenvolver um ensaio melhor adaptado aos requisitos do sistema de saúde aumento o número de ensaios possíveis por dia. Neste momento da otimização do ensaio ainda fizemos o desenvolvimento da solução de automação do projeto, esta solução integra todos os processos necessários para a realização do teste em uma única plataforma automatizada, que nos permite completo acompanhamento e controle do teste, desde da amostra, lavagem, incubações, leitura e finalmente o resultado.

A segunda grande mudança aconteceu com a verificação da contaminação das proteínas de *E.coli* nos antígenos recombinantes interferia no ensaio, com essa confirmação tivemos que testar todos os analitos novamente com um novo bloqueio a fim de verificar se as condições anteriormente determinadas eram verdadeiras.

A terceira mudança que resultou em um aumento maior na confiança do ensaio foi quando passamos a utilizar a estatística correta para o tipo de desenvolvimento que estávamos fazendo a análise da curva ROC. Essa análise nos permitiu calcular os cutoff dos ensaios de forma coerente e precisa, respeitando as

variações intra e inter ensaios que podem ocorrer, e que são inerentes a técnica, esta era anteriormente feita pelo técnico, aumentando a confiança e robustez no desenvolvimento do teste.

E finalmente a realização do multiteste mostrando que o projeto proposto não só é viável mas capaz de detectar as doença de interesse em um único poço. Ainda esta nova abordagem oferece uma solução melhor e inovadora que permite ao país, uma solução nacional desenvolvida por cientistas brasileiros; e aos hemobancos a oportunidade de redução nos custos de suas operações, uma maior independência dos insumos desenvolvidos no exterior, diminuição no trabalho operacional e nos números de equipamentos necessárias nos hemobancos para a determinação.

Apesar de todos os avanços no ensaios ainda temos dificuldade na detecção de algumas doenças como HTLV e HBV, onde ainda não conseguimos que o teste tenha a performance suficiente no formato multiteste. Adicionalmente a detecção dos antígenos circulantes nos pacientes, em especial, para HBsAg (HBV) e P24 de (HIV) ainda não funcionam da forma esperada e apresentam uma baixa sensibilidade, apesar de uma especificidade alta.

Acreditamos que a introdução de novos antígenos, assim como, o ajuste fino dos antígenos que já obtiveram uma perda de performance com a expansão do painel de amostras testadas podem trazer resultados positivos uma vez que estes tinham uma performance com alta sensibilidade e especificidade no Painel AEQ.

Neste sentido estamos tentando a combinação de antígenos, e negociação com os fornecedores dos mesmos com o objetivo de obter estes em condições mais propicias de armazenamento que ajudem tanto na conservação dos antígenos quanto a sua ligação nas microesferas.

Com este projeto publicamos 3 artigos em revistas indexadas:

Foti, L., Fonseca, B. de P. F. e, Nascimento, Lilian Dias, Marques, C. de F. S., Silva, Edmilson Domingos da, Duarte, Cesar Augusto Barros, et al. (2009). Viability study of a multiplex diagnostic platform for Chagas disease. *Memórias do Instituto*

Oswaldo Cruz, 104 Suppl, 136-41. Retrieved August 15, 2011, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753468>.

Duarte, Cesar A B, Foti, L., Nakatani, S. M., Riediger, I. N., Poersch, C. O., Pavoni, D. P., et al. (2010). A novel hepatitis C virus genotyping method based on liquid microarray. *PloS one*, 5(9). doi: 10.1371/journal.pone.0012822.

Fonseca, B. P. F., Marques, C. F. S., Nascimento, Lílian D, Mello, M. B., Silva, L. B. R., Rubim, N. M., et al. (2011). Development of a multiplex bead-based assay for detection of hepatitis C virus. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 18(5), 802-6. doi: 10.1128/CVI.00265-10.

6 CONCLUSÕES

O desenvolvimento do kit diagnóstico caminha de forma consistente visando atender a demanda e realizar todos os testes necessários a triagem sorológica das bolsas de sangue para o SUS.

Fica claro que o desenvolvimento de ensaios multitestos é tecnicamente viável, porém é trabalhoso e oneroso, devido ao grande número de proteínas testadas para se chegar ao protótipo.

A seleção dos antígenos de forma individual se mostrou uma estratégia eficaz na determinação das condições de acoplamento dos antígenos.

A perda de sensibilidade e especificidade no ensaio multitestado era esperada e foi confirmada, e vai exigir refinamento do ensaio de maneira que os antígenos apresentem a mesma performance obtida anteriormente no formato individual.

Uma vez com o protótipo estabelecido poderemos entrar no teste piloto.

A partir dos resultados obtidos podemos inferir que a plataforma testada tem um performance equivalente e em alguns casos melhor que a plataforma padrão ouro ELISA.

Há necessidade do aprimoramento dos ensaios com os anticorpos em conjunto com os antígenos validados.

7 PERSPECTIVAS

O teste piloto encontra-se em fase de implementação, esta fase depende de diversos fatores não dimensionados anteriormente pela equipe técnica, e que tem dependência externas fora das competências técnicas do grupo de desenvolvimento, para ser mais preciso, é necessária a participação do Ministério da Saúde através de um comitê gestor além da presença da ANVISA e da conclusão das negociações do contrato com as empresas Luminex, com a empresa de automação e contrato de serviços de assistência técnica e o refinamento dos ensaios/antígenos avaliados. Estamos buscando otimizar o ensaio multiteste para que o mesmo apresente o mesmo desempenho que os diferentes testes individualizados, o que já foi obtido para uma parcela significativa dos ensaios propostos.

Este projeto também foi o motor principal para o recebimento de diversos financiamentos de grande vulto que permitiram a expansão da estrutura física e recursos humanos do nosso grupo de desenvolvimento. Esses financiamentos nos permitiram criar uma rede de colaboradores em diferentes intuições com diferentes conhecimentos acadêmicos, como Física, Química, Engenharia Elétrica, Informática, Farmácia, entre outros.

A partir dos resultados obtidos com esta colaboração obtivemos um novo financiamento com o objetivo do desenvolvimento de uma solução completa nacional para testes diagnósticos materno-infantil.

Somado a isso temos 1 patente concedida no campo de biomateriais e mais 3 patentes em processo de submissão, além de dois modelos de utilidade para equipamentos de leitura de ensaios diagnósticos.

O projeto de microarranjo não avançou mais devido ao atraso do financiamento de outras etapas que haviam sido previstas como atividades mas não haviam sido previstas financeiramente, pois dependiam do sucesso da viabilidade técnica do projeto. Neste momento de fato esta dependendo da liberação de recurso e assinatura de contratos das outras partes dependentes do projeto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHIKARI, N. K. J.; RUBENFELD, G. D. Worldwide demand for critical care. **Current opinion in critical care**, v. 17, n. 6, p. 620-5, dez 2011a.

ADHIKARI, N. K. J.; RUBENFELD, G. D. Worldwide demand for critical care. **Current opinion in critical care**, v. 17, n. 6, p. 620-5, dez 2011b.

ALBRECHT, B.; LAIRMORE, M. D. Critical role of human T-lymphotropic virus type 1 accessory proteins in viral replication and pathogenesis. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 66, n. 3, p. 396-406, table of contents, set 2002.

ALIROL, E.; GETAZ, L.; STOLL, B.; CHAPPUIS, F.; LOUTAN, L. Urbanisation and infectious diseases in a globalised world. **The Lancet infectious diseases**, v. 11, n. 2, p. 131-41, fev 2011a.

ALIROL, E.; GETAZ, L.; STOLL, B.; CHAPPUIS, F.; LOUTAN, L. Urbanisation and infectious diseases in a globalised world. **The Lancet infectious diseases**, v. 11, n. 2, p. 131-41, fev 2011b.

ALLERS, K.; HÜTTER, G.; HOFMANN, J. *et al.* Evidence for the cure of HIV infection by CCR5 Δ 32/ Δ 32 stem cell transplantation. **Blood**, v. 117, n. 10, p. 2791-9, 10 mar 2011.

ALMEIDA, E.; KRIEGER, M. A.; CARVALHO, M. R.; OELEMANN, W.; GOLDENBERG, S. Use of recombinant antigens for the diagnosis of Chagas disease and blood bank screening. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 4, p. 513-7, 1990.

ALTER, H. J.; KLEIN, H. G. The hazards of blood transfusion in historical perspective. **Blood**, v. 112, n. 7, p. 2617-26, 1 out 2008.

ALTER, M. J.; MARGOLIS, H. S.; KRAWCZYNSKI, K. *et al.* The Natural History of Community-Acquired Hepatitis C in the United States. **N Engl J Med**, v. 27, n. 327, p. 1899-1905, 1992.

ASTELBAUER, F.; WALOCHNIK, J. Antiprotozoal compounds: state of the art and new developments. **International journal of antimicrobial agents**, v. 38, n. 2, p. 118-24, ago 2011.

BARRÉ-SINOUSSE, F.; CHERMANN, J. C.; REY, F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science (New York, N.Y.)**, v. 220, n. 4599, p. 868-71, 20 maio 1983.

BERN, C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. **The New England journal of medicine**, v. 364, n. 26, p. 2527-34, 30 jun 2011.

BERN, C.; KJOS, S.; YABSLEY, M. J.; MONTGOMERY, S. P. Trypanosoma cruzi and Chagas' Disease in the United States. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 4, p. 655-81, out 2011.

BUSCAGLIA, C. A; CAMPO, V. A; FRASCH, A. C. C.; NOIA, J. M. DI. Trypanosoma cruzi surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nature reviews. Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 229-36, mar 2006.

BUSCH, M P; KLEINMAN, S H; JACKSON, B. *et al.* Committee report. Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases: Report of the Interorganizational Task Force on Nucleic Acid Amplification Testing of Blood Donors. **Transfusion**, v. 40, n. 2, p. 143-59, fev 2000a.

BUSCH, M P; KLEINMAN, S H; JACKSON, B. *et al.* Committee report. Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases: Report of the Interorganizational Task Force on Nucleic Acid Amplification Testing of Blood Donors. **Transfusion**, v. 40, n. 2, p. 143-59, fev 2000b.

BUSCH, MICHAEL P; PILCHER, C. D.; MASTRO, T. D. *et al.* Beyond detuning: 10 years of progress and new challenges in the development and application of assays for HIV incidence estimation. **AIDS (London, England)**, v. 24, n. 18, p. 2763-2771, nov 2010a.

BUSCH, MICHAEL P; PILCHER, C. D.; MASTRO, T. D. *et al.* Beyond detuning: 10 years of progress and new challenges in the development and application of assays for HIV incidence estimation. **AIDS (London, England)**, v. 24, n. 18, p. 2763-2771, 27 nov 2010b.

BUTLER, D. Lost in translation. **Nature**, v. 449, n. 7159, p. 158-9, 13 set 2007.

CAMARGO, M. E.; SEGURA, E. L.; KAGAN, I. G. *et al.* Three years of collaboration on the standardization of Chagas' disease serodiagnosis in the Americas: an appraisal. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, v. 20, n. 3, p. 233-44, jan 1986.

CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F.; CATALAN-SOARES, B. C.; CASTRO-COSTA, C. M. *et al.* HTLV in the Americas: challenges and perspectives. **Revista panamericana de salud pública = Pan American journal of public health**, v. 19, n. 1, p. 44-53, jan 2006.

CEJKOVÁ, D.; ZOBANÍKOVÁ, M.; CHEN, L. *et al.* Whole genome sequences of three Treponema pallidum ssp. pertenue strains: yaws and syphilis treponemes differ in less than 0.2% of the genome sequence. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 1, p. e1471, jan 2012.

CLAYTON, J. Chagas disease: pushing through the pipeline. **Nature**, v. 465, n. n7301_suppl, p. S12-S15, jun 2010a.

CLAYTON, J. Chagas disease: pushing through the pipeline. **Nature**, v. 465, n. n7301_suppl, p. S12-S15, 24 jun 2010b.

COURA, JOSÉ RODRIGUES. Chagas disease: what is known and what is needed-- a background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102 Suppl , n. August, p. 113-22, out 2007a.

COURA, JOSÉ RODRIGUES. Chagas disease: what is known and what is needed-- a background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102 Suppl , n. August, p. 113-22, 30 out 2007b.

COURA, JOSÉ RODRIGUES; BORGES-PEREIRA, JOSÉ. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 5-13, 2010.

COUROUCÉ, A M.; PILLONEL, J.; SAURA, C. **Screening of blood donations for HTLV-III. Transfusion medicine reviews**. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10553270>>. , out 1999

DEATON, A. WIDER Annual Lecture 10 Global Patterns of Income and Health : Facts , Interpretations , and Policies. [S.l: s.n.], 2006. p. 25

DIAS, J. C.; SCHOFIELD, C. J. [The control of the transmission by transfusion of Chagas' disease in the Southern Cone Initiative]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 4, p. 373-83, 1998.

DIENSTAG, J. L. Hepatitis B virus infection. **The New England journal of medicine**, v. 359, n. 14, p. 1486-500, out 2008a.

DIENSTAG, J. L. Hepatitis B virus infection. **The New England journal of medicine**, v. 359, n. 14, p. 1486-500, 2 out 2008b.

DOWNES, K. A; YOMTOVIAN, R. Advances in pretransfusion infectious disease testing: ensuring the safety of transfusion therapy. **Clinics in laboratory medicine**, v. 22, n. 2, p. 475-90, jun 2002.

DUBUISSON, J. Hepatitis C virus proteins. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 13, n. 17, p. 2406-15, maio 2007a.

DUBUISSON, J. Hepatitis C virus proteins. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 13, n. 17, p. 2406-15, 7 maio 2007b.

DUNBAR, S. A. Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 363, n. 1-2, p. 71-82, jan 2006.

EASL. EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. **Journal of hepatology**, v. 50, n. 2, p. 227-42, fev 2009.

EASL. EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. **Journal of hepatology**, v. 55, n. 2, p. 245-64, ago 2011.

ELLINGTON, A. A.; KULLO, I. J.; BAILEY, K. R.; KLEE, G. G. Antibody-based protein multiplex platforms: technical and operational challenges. **Clinical chemistry**, v. 56, n. 2, p. 186-93, fev 2010.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, n. 9, p. 871-4, set 1971.

FENTON, K. A.; BREBAN, R.; VARDAVAS, R. *et al.* Infectious syphilis in high-income settings in the 21st century. **The Lancet infectious diseases**, v. 8, n. 4, p. 244-53, abr 2008a.

FENTON, K. A.; BREBAN, R.; VARDAVAS, R. *et al.* Infectious syphilis in high-income settings in the 21st century. **The Lancet infectious diseases**, v. 8, n. 4, p. 244-53, abr 2008b.

FIEBIG, E. W.; WRIGHT, D. J.; RAWAL, B. D. *et al.* Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. **AIDS (London, England)**, v. 17, n. 13, p. 1871-9, set 2003a.

FIEBIG, E. W.; WRIGHT, D. J.; RAWAL, B. D. *et al.* Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. **AIDS (London, England)**, v. 17, n. 13, p. 1871-9, 5 set 2003b.

FUKUHARA, T.; TAKETOMI, A.; MOTOMURA, T. *et al.* Variants in IL28B in Liver Recipients and Donors Correlate With Response to Peg-Interferon and Ribavirin Therapy for Recurrent Hepatitis C. **YGAST**, v. 139, n. 5, p. 1577-1585.e3, 2010.

FULTON, R. J.; MCDADE, R. L.; SMITH, P. L.; KIENKER, L. J.; KETTMAN, J. R. Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system. **Clinical chemistry**, v. 43, n. 9, p. 1749-56, set 1997.

GALLO, ROBERT C. Human retroviruses after 20 years: a perspective from the past and prospects for their future control. **Immunological reviews**, v. 185, n. 1, p. 236-65, jul 2002a.

GALLO, ROBERT C. Human retroviruses after 20 years: a perspective from the past and prospects for their future control. **Immunological reviews**, v. 185, n. 1, p. 236-65, jul 2002b.

GANEM, D.; PRINCE, A. M. Hepatitis B Virus Infection — Natural History and Clinical Consequences. v. 350, p. 1118-29, 2004a.

GANEM, D.; PRINCE, A. M. Hepatitis B Virus Infection — Natural History and Clinical Consequences. v. 350, p. 1118-29, 2004b.

GOMES, Y M; PEREIRA, V. R.; NAKAZAWA, M. *et al.* Serodiagnosis of chronic Chagas infection by using EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 4, p. 497-501, maio 2001.

GOMES, YARA M; LORENA, V. M. B.; LUQUETTI, A. O. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl , n. June, p. 115-21, jul 2009.

GRAVITZ, L. Introduction: A smouldering public-health crisis. **Nature**, v. 474, n. 7350, p. S2-S4, 9 jun 2011.

GUEDES, P. M. M.; SILVA, G. K.; GUTIERREZ, F. R. S.; SILVA, J. S. Current status of Chagas disease chemotherapy. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 9, n. 5, p. 609-20, maio 2011.

HOOFNAGLE, J. H.; BISCEGLIE, A. M. DI. Serologic diagnosis of acute and chronic viral hepatitis. **Seminars in liver disease**, v. 11, n. 2, p. 73-83, maio 1991.

HOPKINS, A. L.; WITTY, M. J.; NWAKA, S. Mission possible. **Nature**, v. 449, n. 7159, p. 166-9, 13 set 2007.

HOUSER, B. Bio-Rad's Bio-Plex® suspension array system, xMAP technology overview. **Archives of physiology and biochemistry**, v. 118, n. May, p. 192-196, 2 ago 2012.

HÜTTER, G.; GANEPOLA, S. Eradication of HIV by transplantation of CCR5-deficient hematopoietic stem cells. **TheScientificWorldJournal**, v. 11, p. 1068-76, jan 2011.

IKEDA, M.; ZHANG, Z. W.; SRIANUJATA, S. *et al.* Prevalence of hepatitis B and C virus infection among working women in Bangkok. **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v. 29, n. 3, p. 469-74, set 1998.

Interim proposal for a WHO Staging System for HIV infection and Disease. Relevé épidémiologique hebdomadaire / Section d'hygiène du Secrétariat de la Société des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations, v. 65, n. 29, p. 221-4, 20 jul 1990.

JOOS, T. O.; STOLL, D.; TEMPLIN, M. F. Miniaturised multiplexed immunoassays. **Current opinion in chemical biology**, v. 6, n. 1, p. 76-80, fev 2002.

JUNQUEIRA, C.; CAETANO, B.; BARTHOLOMEU, D. C. *et al.* The endless race between Trypanosoma cruzi and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 12, n. 2010, p. e29, jan 2010.

KAHN, J. O.; WALKER, B. D. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. **The New England journal of medicine**, v. 339, n. 1, p. 33-9, 2 jul 1998.

KAUL, D. R.; TARANTO, S.; ALEXANDER, C. *et al.* Donor screening for human T-cell lymphotropic virus 1/2: changing paradigms for changing testing capacity. **American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons**, v. 10, n. 2, p. 207-13, mar 2010a.

KAUL, D. R.; TARANTO, S.; ALEXANDER, C. *et al.* Donor screening for human T-cell lymphotropic virus 1/2: changing paradigms for changing testing capacity. **American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons**, v. 10, n. 2, p. 207-13, mar 2010b.

KELLAR, K. L.; IANNONE, M. A. Multiplexed microsphere-based flow cytometric assays. **Experimental hematology**, v. 30, n. 11, p. 1227-37, nov 2002.

KENT, M. E.; ROMANELLI, F. Reexamining syphilis: an update on epidemiology, clinical manifestations, and management. **The Annals of pharmacotherapy**, v. 42, n. 2, p. 226-36, fev 2008.

KLING, J. Moving diagnostics from the bench to the bedside. **Nature biotechnology**, v. 24, n. 8, p. 891-3, ago 2006.

KRIEGER, M. A.; ALMEIDA, E.; OELEMANN, W. *et al.* Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 46, n. 4, p. 427-34, abr 1992a.

KRIEGER, M. A.; ALMEIDA, E.; OELEMANN, W. *et al.* Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 46, n. 4, p. 427-34, abr 1992b.

KRIEGER, M. A.; SALLES, J. M.; ALMEIDA, E. *et al.* Expression and polymorphism of a *Trypanosoma cruzi* gene encoding a cytoplasmic repetitive antigen. **Experimental parasitology**, v. 70, n. 3, p. 247-54, abr 1990.

LABONTÉ, R.; MOHINDRA, K.; SCHRECKER, T. The growing impact of globalization for health and public health practice. **Annual review of public health**, v. 32, p. 263-83, 21 abr 2011.

LAFAILLE, J. J.; LINSS, J.; KRIEGER, M. A. *et al.* Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 35, n. 2, p. 127-36, jun 1989a.

LAFAILLE, J. J.; LINSS, J.; KRIEGER, M. A. *et al.* Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 35, n. 2, p. 127-36, 15 jun 1989b.

LAI, C. L.; RATZIU, V.; YUEN, M.; POYNARD, T. Viral hepatitis B. v. 362, p. 2089-2094, 2003a.

LAI, C. L.; RATZIU, V.; YUEN, M.; POYNARD, T. Viral hepatitis B. v. 362, p. 2089-2094, 2003b.

LEIBY, D. A.; LENES, B. A.; TIBBALS, M. A.; TAMES-OLMEDO, M. T. Prospective evaluation of a patient with *Trypanosoma cruzi* infection transmitted by transfusion. **The New England journal of medicine**, v. 341, n. 16, p. 1237-9, 14 out 1999.

LEQUIN, R. M. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Clinical chemistry**, v. 51, n. 12, p. 2415-8, dez 2005.

LOPEZ, A. D.; MATHERS, C. D. Measuring the global burden of disease and epidemiological transitions: 2002-2030. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 100, n. 5-6, p. 481-99, 2006.

LÓPEZ-ANTUÑANO, F. J. [The chemotherapy of infections produced by *Trypanosoma cruzi*]. **Salud pública de México**, v. 39, n. 5, p. 463-71, 1997.

MARCO, V. DI; IACONO, O. LO; CAMMÀ, C. *et al.* The long-term course of chronic hepatitis B. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 30, n. 1, p. 257-64, jul 1999.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; VIZUET-DE-RUEDA, J. C.; FLORENCIO-MARTÍNEZ, L. E.; MANNING-CELA, R. G.; FIGUEROA-ANGULO, E. E. Gene expression in trypanosomatid parasites. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2010, p. 525241, jan 2010.

MEDLEY, G. F. Epidemiology. Predicting the unpredictable. **Science (New York, N.Y.)**, v. 294, n. 5547, p. 1663-4, 23 nov 2001.

MIYAKAWA, H.; TANAKA, A.; SELMI, C. *et al.* Serum reactivity against bacterial pyruvate dehydrogenase: increasing the specificity of anti-mitochondrial antibodies for the diagnosis of primary biliary cirrhosis. **Clinical & developmental immunology**, v. 13, n. 2-4, p. 289-94, 2006.

MOREL, C. M.; CARVALHEIRO, J. R.; ROMERO, C. N. P.; COSTA, E. A.; BUSS, P. M. The road to recovery. **Nature**, v. 449, n. 7159, p. 180-2, 13 set 2007.

MOREL, C. M.; LAZDINS, J. Chagas disease. **Nature reviews. Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 14-5, out 2003.

MORENS, D. M.; FOLKERS, G. K.; FAUCI, A. S. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. **Nature**, v. 430, n. 6996, p. 242-9, 8 jul 2004.

MORENS, D. M.; FOLKERS, G. K.; FAUCI, A. S. Emerging infections: a perpetual challenge. **The Lancet infectious diseases**, v. 8, n. 11, p. 710-9, nov 2008.

MORGAN, E.; VARRO, R.; SEPULVEDA, H. *et al.* Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v. 110, n. 3, p. 252-66, mar 2004.

MS. Diretrizes para controle da sífilis congênita: manual de bolso. [S.l.: s.n.], 2006.

OELEMANN, W. M.; TEIXEIRA, M. D.; VERÍSSIMO DA COSTA, G. C. *et al.* Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of Chagas' disease. **Journal of clinical microbiology**, v. 36, n. 9, p. 2423-7, set 1998.

OHTO, H.; TERAZAWA, S.; SASAKI, N. *et al.* Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. The Vertical Transmission of Hepatitis C Virus Collaborative Study Group. **The New England journal of medicine**, v. 330, n. 11, p. 744-50, 17 mar 1994.

ORTON, S. Syphilis and blood donors: what we know, what we do not know, and what we need to know. **Transfusion medicine reviews**, v. 15, n. 4, p. 282-91, out 2001.

O'CONNELL, D. Neglected Diseases. **Nature**, v. 449, n. 7159, p. 157-157, set 2007a.

O'CONNELL, D. Neglected Diseases. **Nature**, v. 449, n. 7159, p. 157-157, 13 set 2007b.

PANTALEO, G.; DEMAREST, J. F.; SCHACKER, T. *et al.* The qualitative nature of the primary immune response to HIV infection is a prognosticator of disease progression independent of the initial level of plasma viremia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 1, p. 254-8, 7 jan 1997.

PENIN, F.; DUBUISSON, J.; REY, F. A; MORADPOUR, D.; PAWLOTSKY, J.-M. Structural biology of hepatitis C virus. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 39, n. 1, p. 5-19, jan 2004.

PERKINS, H. A; BUSCH, MICHAEL P. Transfusion-associated infections: 50 years of relentless challenges and remarkable progress. **Transfusion**, v. 50, n. 10, p. 2080-99, out 2010a.

PERKINS, H. A; BUSCH, MICHAEL P. Transfusion-associated infections: 50 years of relentless challenges and remarkable progress. **Transfusion**, v. 50, n. 10, p. 2080-99, out 2010b.

PERZ, J. F.; ARMSTRONG, G. L.; FARRINGTON, L. A; HUTIN, Y. J. F.; BELL, B. P. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. **Journal of hepatology**, v. 45, n. 4, p. 529-38, out 2006.

PETERSEN, L. R.; SATTEN, G. A.; DODD, R. *et al.* Duration of time from onset of human immunodeficiency virus type 1 infectiousness to development of detectable antibody. The HIV Seroconversion Study Group. **Transfusion**, v. 34, n. 4, p. 283-9, abr 1994.

POIESZ, B. J.; RUSCETTI, F. W.; GAZDAR, A F. *et al.* Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 12, p. 7415-9, dez 1980.

REEVES, J. D.; DOMS, R. W. Human immunodeficiency virus type 2. **The Journal of general virology**, v. 83, n. Pt 6, p. 1253-65, jun 2002a.

REEVES, J. D.; DOMS, R. W. Human immunodeficiency virus type 2. **The Journal of general virology**, v. 83, n. Pt 6, p. 1253-65, jun 2002b.

SABINO, E C; ZREIN, M.; TABORDA, C. P. *et al.* Evaluation of the INNO-LIA HTLV I/II assay for confirmation of human T-cell leukemia virus-reactive sera in blood bank donations. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1324-8, maio 1999.

SALEMI, M.; VANDAMME, A M.; DESMYTER, J.; CASOLI, C.; BERTAZZONI, U. The origin and evolution of human T-cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) and the relationship with its replication strategy. **Gene**, v. 234, n. 1, p. 11-21, 24 jun 1999.

SCHEIBLAUER, H.; EL-NAGEH, M.; NICK, S. *et al.* Evaluation of the performance of 44 assays used in countries with limited resources for the detection of antibodies to hepatitis C virus. **Transfusion**, v. 46, n. 5, p. 708-18, maio 2006.

SEEGER, C.; MASON, W. S. Hepatitis B Virus Biology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 1, p. 51-68, mar 2000a.

SEEGER, C.; MASON, W. S. Hepatitis B Virus Biology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 1, p. 51-68, 1 mar 2000b.

SEIKI, M.; HATTORI, S.; HIRAYAMA, Y.; YOSHIDA, M. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 12, p. 3618-22, jun 1983.

SHARMA, S. D. Hepatitis C virus: molecular biology & current therapeutic options. **The Indian journal of medical research**, v. 131, n. January, p. 17-34, jan 2010.

SILVEIRA, J. F. DA; UMEZAWA, E. S.; LUQUETTI, A O. Chagas disease: recombinant Trypanosoma cruzi antigens for serological diagnosis. **Trends in parasitology**, v. 17, n. 6, p. 286-91, jun 2001a.

SILVEIRA, J. F. DA; UMEZAWA, E. S.; LUQUETTI, A O. Chagas disease: recombinant Trypanosoma cruzi antigens for serological diagnosis. **Trends in parasitology**, v. 17, n. 6, p. 286-91, jun 2001b.

SIMMONDS, P.; BUKH, J.; COMBET, C. *et al.* Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 42, n. 4, p. 962-73, out 2005a.

SIMMONDS, P.; BUKH, J.; COMBET, C. *et al.* Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 42, n. 4, p. 962-73, out 2005b.

SMITH, J. A.; DANIEL, R. Following the path of the virus: the exploitation of host DNA repair mechanisms by retroviruses. **ACS chemical biology**, v. 1, n. 4, p. 217-26, 23 maio 2006.

STANSBURY, L. G.; HESS, J. R. Blood transfusion in World War I: the roles of Lawrence Bruce Robertson and Oswald Hope Robertson in the "most important medical advance of the war". **Transfusion medicine reviews**, v. 23, n. 3, p. 232-6, jul 2009.

STEPHENS, H. A F. Immunogenetic surveillance of HIV/AIDS. Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases, n. May, 7 maio 2012.

SUZUKI, Y.; GOJOBORI, T. The origin and evolution of human T-cell lymphotropic virus types I and II. **Virus genes**, v. 16, n. 1, p. 69-84, jan 1998a.

SUZUKI, Y.; GOJOBORI, T. The origin and evolution of human T-cell lymphotropic virus types I and II. **Virus genes**, v. 16, n. 1, p. 69-84, jan 1998b.

TANAKA, Y.; NISHIDA, N.; SUGIYAMA, M. *et al.* Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. **Nature Genetics**, v. 41, n. 10, p. 1105-1109, 2009.

THÉ, G. DE; BOMFORD, R. An HTLV-I vaccine: why, how, for whom? **AIDS research and human retroviruses**, v. 9, n. 5, p. 381-6, maio 1993.

TUNGOL, A.; RADEMACHER, K.; SCHAFER, J. A. Formulary management of the protease inhibitors boceprevir and telaprevir for chronic hepatitis C virus. **Journal of managed care pharmacy : JMCP**, v. 17, n. 9, p. 685-94, nov 2011.

TÁRNOK, A.; HAMBSCH, J.; CHEN, R.; VARRO, R. Cytometric bead array to measure six cytokines in twenty-five microliters of serum. **Clinical chemistry**, v. 49, n. 6 Pt 1, p. 1000-2, jun 2003.

URDEA, M.; PENNY, L. A; OLMSTED, S. S. *et al.* Requirements for high impact diagnostics in the developing world. **Nature**, v. 444 Suppl , p. 73-9, 23 nov 2006.

VERDONCK, K.; GONZÁLEZ, E.; DOOREN, S. VAN; *et al.* Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. **The Lancet infectious diseases**, v. 7, n. 4, p. 266-81, abr 2007a.

VERDONCK, K.; GONZÁLEZ, E.; DOOREN, S. VAN; *et al.* Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. **The Lancet infectious diseases**, v. 7, n. 4, p. 266-81, abr 2007b.

VIGNALI, D. A. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. **Journal of immunological methods**, v. 243, n. 1-2, p. 243-55, set 2000a.

VIGNALI, D. A. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. **Journal of immunological methods**, v. 243, n. 1-2, p. 243-55, 21 set 2000b.

VRIELINK, H.; ZAAIJER, H. L.; REESINK, H. W. The clinical relevance of HTLV type I and II in transfusion medicine. **Transfusion medicine reviews**, v. 11, n. 3, p. 173-9, jul 1997.

WALKER, D. G.; WALKER, G. J. A. Personal view Forgotten but not gone: the continuing scourge of congenital syphilis Personal view. **The Lancet**, v. 2, n. July, p. 432-436, 2002a.

WALKER, D. G.; WALKER, G. J. A. Personal view Forgotten but not gone: the continuing scourge of congenital syphilis Personal view. **The Lancet**, v. 2, n. July, p. 432-436, 2002b.

WATERBOER, T.; SEHR, P.; PAWLITA, M. Suppression of non-specific binding in serological Luminex assays. **Journal of immunological methods**, v. 309, n. 1-2, p. 200-4, 20 fev 2006.

WHO. THE GLOBAL ELIMINATION OF CONGENITAL SYPHILIS: RATIONALE AND STRATEGY FOR ACTION. [S.l: s.n.], 2007.

WU, A. H. B. A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 369, n. 2, p. 119-24, 23 jul 2006.

YALOW, R. S.; BERSON, S. A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. **The Journal of clinical investigation**, v. 39, p. 1157-75, jul 1960.

YAN, X.; ZHONG, W.; TANG, A. *et al.* Multiplexed flow cytometric immunoassay for influenza virus detection and differentiation. **Analytical chemistry**, v. 77, n. 23, p. 7673-8, 1 dez 2005.

YOSHIDA, M.; SEIKI, M.; YAMAGUCHI, K.; TAKATSUKI, K. Monoclonal integration of human T-cell leukemia provirus in all primary tumors of adult T-cell leukemia suggests causative role of human T-cell leukemia virus in the disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 8, p. 2534-7, abr 1984.

ZACHARY, P.; ULLMANN, M.; DJEDDI, S. *et al.* Evaluation of three commercially available hepatitis C virus antibody detection assays under the conditions of a clinical virology laboratory. **Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 34, n. 3, p. 207-10; discussion 216-8, nov 2005.

ZEIN, N. N.; GERMER, J. J.; WENDT, N. K. *et al.* Indeterminate results of the second-generation hepatitis C virus (HCV) recombinant immunoblot assay: significance of high-level c22-3 reactivity and influence of HCV genotypes. **Journal of clinical microbiology**, v. 35, n. 1, p. 311-2, jan 1997.